

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. M. Reincke

**Molekulare Wirkmechanismen des
IGF-1-Rezeptor-Antagonisten NVP-AEW541
beim Multiplen Myelom**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Hilke Hagemeyer

aus

Stadthagen

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatte:r: Priv. Doz. Dr. med. Ralf Schmidmaier

Mitberichterstatte:r: Priv. Doz. Dr. med. Christina Rieger
Priv. Doz. Dr. med. Christian Straka

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Philipp Baumann

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 1.07.2010

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 2. Patienten, Material und Methoden | 8 |
| 2.1 Zellkultur | 8 |
| 2.1.1 Zelllinien | 8 |
| 2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen | 9 |
| 2.1.3 Zellzahlbestimmung | 9 |
| 2.1.4 Gewinnung mononukleärer Zellen | 10 |
| 2.2 Proliferationsmessung/ WST-1-Assay | 11 |
| 2.2.1 WST-1-Assay | 11 |
| 2.2.2 Isobologramm Analyse | 11 |
| 2.3 Durchflusszytometrische Analysen | 12 |
| 2.3.1 Durchflusszytometrie | 12 |
| 2.3.2 Analyse der Oberflächenmarkerexpression | 13 |
| 2.3.3 Fluoresceinisothiocyanat (FITC) | 14 |
| 2.3.4 Phycoerythrin (PE) | 14 |
| 2.3.5 Apoptosedetektion mittels AnnexinV-FITC/PI- Markierung | 15 |
| 2.3.6 Zellzyklusanalyse/ SubG ₁ -Messung | 17 |
| 2.4 Western Blotting | 19 |
| 2.4.1 Zelllyse | 19 |
| 2.4.2 Gel-Elektrophorese | 20 |
| 2.4.3 Transferblot | 21 |
| 2.4.4 Proteinnachweis | 22 |
| 2.4.5 Membran-Stripping | 22 |
| 2.4.6 Pufferlösungen | 23 |
| 2.5 Statistik | 24 |

| | |
|--|-----------|
| 3 Ergebnisse | 25 |
| 3.1 Der IGF-1-Rezeptor (CD221) wird von den Myelomzelllinien stark exprimiert | 25 |
| 3.2 NVP-AEW541 hemmt das Zellwachstum von Myelomzelllinien | 26 |
| 3.3 NVP-AEW541 induziert Apoptose bei Myelomzellen | 28 |
| 3.3.1 NVP-AEW541 induziert Apoptose bei Myelomzelllinien | 28 |
| 3.3.2 NVP-AEW541 induziert Apoptose bei primären Myelomzellen | 31 |
| 3.3.3 NVP-AEW541 induziert keine Apoptose bei PBMCs | 32 |
| 3.4 NVP-AEW541 hemmt die IGF-1-abhängige Proliferation der Myelomzelllinien | 33 |
| 3.4.1 NVP-AEW541 hemmt die Proliferation der Myelomzelllinien unter IGF-1-Stimulation | 33 |
| 3.4.2 NVP-AEW541 führt zu einer geringen Abnahme der Knochenmarkstroma-Medium-vermittelten Proliferation der Myelomzelllinien | 35 |
| 3.5 NVP-AEW541 hemmt die P70S6-Kinase und 4E-BP-1 | 37 |
| 3.6 Synergismus von IGF-1-R-Inhibition und mTOR-Inhibition | 39 |
| 3.6.1 NVP-AEW541 wirkt synergistisch mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 (Everolimus) auf die Inhibierung des Zellwachstums von Myelomzelllinien | 39 |
| 3.6.2 Der mTOR-Inhibitor RAD001 (Everolimus) und NVP-AEW541 führen in Kombination zu einer stärkeren Dephosphorylierung von P70S6K und 4E-BP-1 als jede Substanz alleine | 41 |
| 3.6.3 NVP-AEW541 und/oder RAD001 (Everolimus) führen nicht zu einer Apoptose-Induktion bei PBMCs gesunder Spender | 42 |
| 4. Diskussion | 43 |
| 5. Zusammenfassung | 49 |
| 6. Literaturverzeichnis | 51 |

| | |
|---|-----------|
| 7. Abkürzungsverzeichnis | 61 |
| 8. Abbildungsverzeichnis | 64 |
| 9. Anhang | 66 |
| 9.1 Verwendete Materialien und Geräte | 66 |
| 9.1.1 Zellkultur | 66 |
| 9.1.2 Zytostatika | 67 |
| 9.1.3 Inhibitoren | 67 |
| 9.1.4 Zytokine | 67 |
| 9.1.5 Antikörper und Oberflächenmessungen | 67 |
| 9.1.6 Antikörper für die Western Blot Analyse | 68 |
| 9.1.6.1 Primärantikörper | 68 |
| 9.1.6.2 Sekundärantikörper | 68 |
| 9.1.7 Enzyme | 68 |
| 9.1.8 Chemikalien | 69 |
| 9.1.9 Sonstige Artikel für den Western Blot | 70 |
| 9.1.10 Geräte | 70 |
| 9.2 Danksagung | 71 |

Die wesentlichen Teile der vorliegenden Arbeit wurden in einer allgemein anerkannten, internationalen Wissenschaftszeitschrift veröffentlicht:

Philipp Baumann; Hilke Hagemeier; Sonja Mandl-Weber; Daniel Franke; Ralf Schmidmaier. **Myeloma cell growth inhibition is augmented by synchronous inhibition of the insulin-like growth factor-1 receptor by NVP-AEW541 and inhibition of mammalian target of rapamycin by Rad001.** *Anti-Cancer Drugs*. 2009 April; 20(4): 259-66.

Impact Factor: 2.358

1. EINLEITUNG

Das Multiple Myelom gehört zu den reifen B-Zell-lymphoiden Neoplasien und ist durch eine Anhäufung maligner Plasmazellen im Knochenmark-Kompartiment, eine vermehrte Produktion monoklonaler Immunglobuline und Knochendestruktion charakterisiert. Ein prämaligener Zustand, eine sogenannte monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz (MGUS), die bei 1% der Menschen über 50 Jahren auftritt, kann dieser Erkrankung vorausgehen (Berenson et al., 2009; Kyle et al., 2005).

Das Multiple Myelom macht 1% aller malignen Erkrankungen und ca. 10% aller hämatologischen Malignome aus (Jemal et al., 2009).

Bei Erstdiagnose sind die Patienten im Mittel 66 Jahre alt, wobei 38% der Patienten älter als 70 Jahre und nur 2% jünger als 40 Jahre sind (Kyle et al., 2003). Die mittlere jährliche altersspezifische Inzidenzrate des Multiplen Myeloms steigt stark mit dem Alter an, wobei die mittlere jährliche altersjustierte Inzidenzrate bei Männern mit etwa 5/100.000 und bei Frauen mit etwa bei 3/100.000 angegeben werden kann (Ries et al., 2004). In Deutschland kann somit von einer Neuerkrankungszahl von ca. 3200 pro Jahr ausgegangen werden.

Unbehandelt versterben die Patienten nach durchschnittlich sechs Monaten, unter Therapie beträgt das mediane Überleben derzeit ca. 5 Jahre (Kumar et al., 2008). Das Multiple Myelom ist in einem Großteil der Fälle nicht heilbar, dennoch kann bei etwa 10-15% der Patienten unter sehr intensiver Therapie eine dauerhafte komplette Remission über 10 Jahre erreicht werden (Barlogie et al., 2006; Fassas et al., 2005). Insgesamt ist die Erkrankung für etwa 20% der Todesfälle hämatologischer Malignome und 2% aller Krebserkrankungen verantwortlich (Ries et al., 2004).

Beim Multiplen Myelom sind die malignen Zellen in den meisten Fällen, mit Ausnahme der Plasmazellleukämie und beim Extramedullärbefall, im Knochenmark lokalisiert und vom Knochenmarkstroma abhängig. Im Knochenmark verdrängen sie die physiologische Blutbildung und synthetisieren und sezernieren monoklonale Immunglobuline (zu 52% IgG, zu 21% IgA und zu 2% IgD) oder zu 16% nur deren Leichtketten (κ oder λ). In seltenen Fällen sind sie asekretorisch (7%) (Kyle et al.,

2003). Noch seltener handelt es sich um einen solitären Tumor aus malignen Plasmazellen (Plasmozytom), der ossär oder extraossär gelegener sein kann.

Der Beginn der Myelomerkrankung verläuft zumeist klinisch stumm und erst in fortgeschrittenen Stadien zeigen sich komplikationsbedingt vielfältige charakteristische Symptome, die sich auf den Tumor selbst, seine Produkte und die Folgen für den Wirtsorganismus zurückführen lassen. Die Beschwerden oder Auffälligkeiten, mit denen sich ein Großteil der Patienten vorstellt, lassen sich häufig auf die Infiltration der malignen Zellen in den Knochen, das Knochenmark oder andere Organe oder auf eine Nierenschädigung zurückführen (Rajkumar et al., 2009). So finden sich bei Erstdiagnose häufig eine Anämie (73%), Knochenschmerzen (58%), ein erhöhtes Kreatinin (48%) und eine Hyperkalzämie (28%) (Kyle et al., 2003).

Die bewegungsabhängigen Knochenschmerzen, über die knapp 60% der Patienten bei Diagnosestellung klagen sind vor allem in der Brust- und Lendenwirbelsäule, sowie den Rippen, seltener in den Extremitäten lokalisiert. Verursacht werden sie durch osteolytische Läsionen, diffuse Osteoporose und pathologische Frakturen, hervorgerufen durch eine Stimulation der Osteoklasten und Hemmung der Osteoblasten durch die Myelomzellen, sowie durch die Myelomzell-Proliferation.

Ein weiteres häufiges klinisches Problem der Myelompatienten ist eine erhöhte Infektanfälligkeit. Diese äußert sich in rezidivierenden, oft schwer therapierbaren, vor allem bakteriellen Infektionen, häufig durch *Streptococcus pneumoniae* und gramnegative Bakterien verursacht (Rajkumar et al., 2009). Besonders Pneumonien und Bronchitiden treten in frühen Krankheitsstadien häufig auf. Vor allem in fortgeschrittenen Krankheitsstadien kann es zur Manifestation einer lebensbedrohlichen Sepsis kommen. Ursache dieser erhöhten Infektanfälligkeit ist eine funktionelle Hypogammaglobulinämie verursacht durch verminderte Produktion und erhöhten Abbau physiologischer Antikörper, sowie eine durch Infiltration und Verdrängung des blutbildenden Knochenmarks durch den Tumor entstehende Granulozytopenie.

Als weitere Folge der Knochenmarksinfiltration oder hervorgerufen durch die Niereninsuffizienz tritt häufig eine Anämie (zumeist normochrom, normozytär) auf, die in 73% bereits bei Diagnosestellung besteht und bei 97% der Patienten irgendwann im Laufe der Erkrankung vorkommt (Kyle et al., 2003). Hämorrhagische Diathesen durch immunglobulingebundene und somit inaktivierte Gerinnungsfaktoren treten v.a.

in Kombination mit Thrombozytopenie auf. Auffälligkeiten der Nierenfunktion mit pathophysiologisch unterschiedlichsten Ursachen können in jedem Krankheitsstadium auftreten und führen bei 50% der Patienten zu einer multifaktoriell bedingten manifesten Niereninsuffizienz, die zu 10% dialysepflichtig ist (Lamerz et al., 2002). Im Einzelnen kann die Nierenfunktion durch eine Hyperkalzämie, sowie bei Patienten, die Leichtketten sezernieren durch die Cast-Nephropathie („Myelomniere“) beeinträchtigt werden. Auch glomeruläre Amyloidablagerungen beim Leichtkettenmyelom, oft in Zusammenspiel mit medikamenten-induzierter Nierenschädigung spielen eine Rolle (Rajkumar et al., 2009).

Das Multiple Myelom ist eine Erkrankung, deren Therapieergebnisse nach wie vor unbefriedigend sind. Zwar hat sich die mittlere Überlebenszeit in der vergangenen Dekade stetig verbessert, wie jüngste populationsbasierte Studien zeigen (Kumar et al., 2008; Kastritis et al., 2009; Kristinsson et al., 2007), dennoch kann nur bei etwa 10-15% der Patienten unter sehr intensiver Therapie eine dauerhafte komplette Remission über 10 Jahre erreicht werden (Barlogie et al., 2006; Fassas et al., 2005).

Diese Verbesserung scheint vorrangig auf die Einführung der Hochdosischemotherapie, gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation (Attal et al., 1996), der Einführung neuer Substanzen wie Thalidomid, Lenalidomid und Bortezomib und besserer supportiver Therapie zurückzuführen zu sein (Kumar et al., 2008).

Konkret besteht die derzeitige Therapie der Wahl bei jungen Patienten (<65 Jahren) aus einer Induktionstherapie, gefolgt von einer Tandem-Hochdosis-Chemotherapie mit Melphalan, ermöglicht durch die anschließende autologe Stammzelltransplantation. Diese Therapie scheint auch bei einigen Patienten über 65 Jahren, einschließlich einiger weniger Patienten über 70 Jahren durchführbar zu sein; dabei handelt es sich jedoch um keinen klinischen Standard (Attal et al., 1996; Badros et al., 2001; Jantunen et al., 2006). Bei älteren Patienten bestehen die aktiveren Therapien aus intermittierenden Zyklen von Melphalan und Prednison in Kombination mit Thalidomid, Bortezomib (Velcade) oder Lenalidomid (Revlimid) (Palumbo et al., 2006; Facon et al., 2007; Venon et al., 2009; Attal et al., 2009).

Melphalan und Prednison bildeten seit ihrer Einführung als Myelom-Therapeutika vor 40 Jahren lange Zeit die Eckpfeiler der Therapie (Myeloma Trialists' Collaborative

Group, 1998), worunter sich das mittlere Überleben auf drei Jahre verlängern ließ (Barlogie et al., 1984). Neuere Therapieansätze mit Kombinations-Chemotherapien mit drei oder mehr Zytostatika führten zwar zu einer höheren Ansprechrate, die Mortalität konnte allerdings im Vergleich zu einer Therapie mit Melphalan und Prednison nicht verringert werden (Myeloma Trialists' Collaborative Group, 1998). Erst die Einführung der Hochdosischemotherapie, gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation konnte die mittlere Überlebenszeit auf 54 bis zu 66 Monaten erhöhen (Child et al., 2003; Jantunen et al., 2006; Attal et al., 1996). Durch eine doppelte autologe Stammzelltransplantation nach Hochdosischemotherapie konnte eine erneute Verbesserung des Gesamtüberlebens erzielt werden (Attal et al., 2003). Neuere Therapieansätze beinhalten den Einsatz von Bortezomib aus der Gruppe der Proteasomeninhibitoren, sowie Thalidomid und Lenalidomid aus der Gruppe der Immunmodulatory Drugs (IMiDs®). Ein anderer Therapieansatz besteht in der allogenen Transplantation, für die ein guter Graft-versus-Myelom-Effekt gezeigt werden konnte. Allerdings ist diese Behandlung aufgrund der hohen Mortalität im Rahmen der hochdosierten myeloablativen Therapie im Vorfeld jungen rückfälligen/ refraktären Patienten vorbehalten (Bruno et al., 2009).

Trotz all dieser Fortschritte ist eine Heilung in einem Großteil der Fälle nach wie vor nicht möglich und die Myelomzellen werden im Laufe der Therapie resistent gegenüber den eingesetzten Zytostatika. Es kommt zu einer Progression der Erkrankung und die Patienten versterben an Infektionen, meist Pneumonien, Hämorrhagien oder den Folgen der Niereninsuffizienz (Oshima et al., 2001).

Beim Multiplen Myelom findet sich der maligne Plasmazellklon meist im Knochenmark, wobei das dortige Mikroenvironment/Milieu nachweislich das Überleben, die Resistenzentwicklung, sowie die Proliferation der Myelomzellen unterstützt. Vermittelt wird dies zum einen durch Zelladhäsionsmechanismen (Schmidmaier et al., 2004; Schmidmaier et al., 2006), zum anderen durch Wachstumsfaktoren, wie IGF-1 (insulin-like growth factor-1) und VEGF (vascular endothelial growth factor) und Zytokine, wie IL-6 (interleukin-6), IL-10 (interleukin-10), SDF-1 (stromal-derived factor-1) und andere (Baumann et al., 2007; Baumann et al., 2008; Gupta et al., 2001).

IGF-1 spielt eine zentrale Rolle bei der Stimulation des Zellwachstums und Inhibition der Apoptose (Ge et al., 2000; Tu et al., 2000). Die Bindung von IGF-1 an den IGF-1-Rezeptor, einem Transmembranrezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität, führt zur Autophosphorylierung von Tyrosinresten der intrazellulären Rezeptordomäne, was eine Potenzierung der Aktivität der Rezeptortyrosinkinase nach sich zieht (Lopaczynski, 2000). Dies wiederum führt über eine Tyrosin-Phosphorylierung von Adaptermolekülen, wie IRS1 (Insulin-Rezeptor-Substrat-1) und IRS2 (Insulin-Rezeptor-Substrat-2) zur Aktivierung von Signalkaskaden, wie dem Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3K)- / Akt-/ mammalian Target of Rapamycin (mTOR)-Signalweg, sowie dem Ras/Raf/Mitogen-activated-Proteinkinase (MAP)-Signalweg (Grønborg et al., 1993; Brodt et al., 2000; Laviola et al., 2007) (s. Abb 1.1). Beide Wege induzieren Zellwachstum, Proliferation, Angiogenese, Resistenzentwicklung und Metastasierung maligner Zellen. Passend dazu konnte eine erhöhte Expression von IGF-1 und /oder des IGF-1-Rezeptors bei einer Vielzahl humaner Malignome, wie Karzinomen der Lunge, der Brust, der Schilddrüse, des Gastrointestinaltraktes und der Prostata, sowie bei Glioblastomen, Neuroblastomen, Rhabdomyosarkomen und bei Leukämien gemessen werden (Macaulay et al., 1992).

Die Hemmung des IGF-1-Rezeptors scheint somit einen vielversprechenden Angriffspunkt einer molekularen, zielgerichteten Therapie darzustellen, was hier am Beispiel des Multiplen Myeloms untersucht werden soll.

Verschiedenste Substanzen zur Beeinflussung des IGF-1-Rezeptors, wie z.B. Oligonukleotide, monoklonale Antikörper und kleinmolekulare Tyrosinkinase-Inhibitoren werden derzeit untersucht (Chitnis et al., 2008). Die kleinmolekularen Tyrosinkinase-Inhibitoren, wie die hier untersuchte Substanz NVP-AEW541 haben dabei den Vorteil, dass sie oral eingenommen werden können. Bei der Substanz NVP-AEW541 der Firma Novartis handelt es sich um einen hoch-selektiven IGF-1-Rezeptor-Inhibitor, der zu der Familie der Pyroll[2,3-d]Pyrimidine gehört (García-Echeverría, 2004) und sich noch in der präklinischen Phase befindet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von NVP-AEW541 auf Myelomzelllinien und primäre Myelomzellen untersucht. In Kenntnis der Rolle von IGF-1 für Sti-

mulation des Zellwachstums und Inhibition der Apoptose (Ge et al., 2000; Tu et al., 2000), sowie der auf die Rezeptorbindung folgenden intrazellulären Vorgänge, wurde der Einfluss der Blockade des IGF-1-Rezeptors durch NVP-AEW541 betrachtet: Die Beeinflussung von Zellwachstum und Apoptose durch die Substanz, Auswirkungen auf den Zellzyklus und Beeinflussung des Ras/Raf/Mitogen-activated-Proteinkinase-Signalweges, sowie die Beeinflussung des PI-3K-/ Akt-/ mTOR-Signalweges.

Als ein Protein dieses durch Wachstums- und Überlebensfaktoren aktivierbaren PI3K-/AKT-Signalweges spielt mTOR eine wichtige Rolle beim Multiplen Myelom. Die Inhibition von mTOR blockierte das Zellwachstum von Myelomzellen in vitro und in präklinischen Tiermodellen (Hu et al., 2003; Frost et al., 2004). Der mTOR-Inhibitor RAD001 (Everolimus), ein Rapamycinderivat ist zur Immunsuppression und zur Therapie des Nierenzellkarzinoms anerkannt. In einer Phase I/II-Studie konnten bei Patienten mit refraktärem Myelom oder Rezidiv vielversprechende Resultate erzielt werden (Guenther et al., 2009). Nachdem O'Reilly et al. zeigen konnten, dass die Kombination aus mTOR-Inhibition (hier durch Rapamycin) und IGF-1R-Inhibition durch NVP-AEW541 in einer additiven Proliferationshemmung in Prostata - und Mammakarzinomzelllinien resultierte (O'Reilly et al., 2006), wählten wir einen ähnlichen Ansatz für die Myelomzelllinien.

Durch Koinkubation von NVP-AEW541 mit RAD001 (Everolimus) wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwieweit sich eine solche additive Proliferationshemmung bei gleichzeitiger IGF-1R- und mTOR-Hemmung auch bei Myelomzelllinien findet.

In Zusammenschau mit den vorherigen Experimenten sollte so die Wirkung des IGF-1R-Inhibitors NVP-AEW541 beim Multiplen Myelom charakterisiert und möglicherweise eine Rationale für einen klinischen Einsatz des IGF-1R-Antagonisten NVP-AEW541 aufgestellt werden.

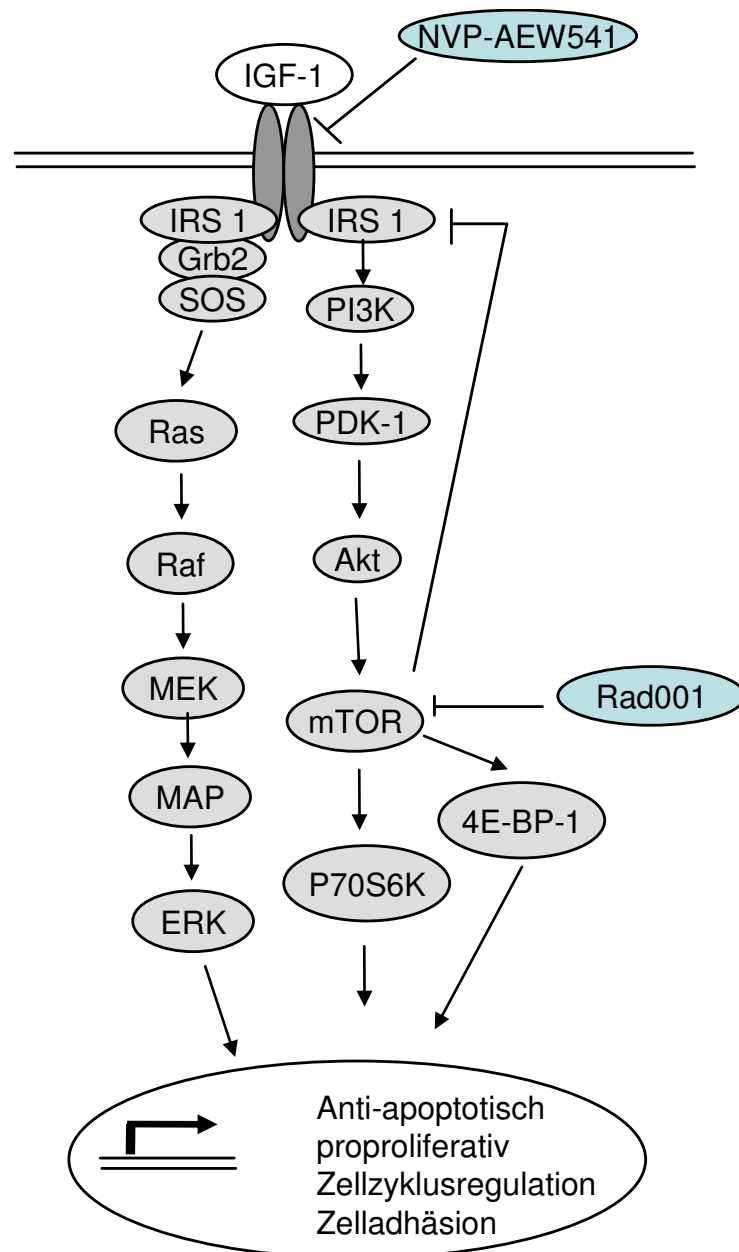


Abbildung 1.1: Wichtige Signalwege beim Multiplen Myelom. Der insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1-Rezeptor) vermittelt über die Aktivierung des Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI-3K)/ Akt/ mammalian Target of Rapamycin (mTOR)-Signalweges, sowie die Aktivierung des Ras/ Raf/ mitogen-activated-Proteinkinase (MAP)- Signalweges Zellwachstum, Zelladhäsion und wirkt antiapoptotisch. Die Substanz NVP-AEW541 wirkt als IGF-1-Rezeptor-Inhibitor, während RAD001 (Everolimus) mTOR hemmt.

2. PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Materialien, Chemikalien und Geräte findet sich im Anhang.

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

Die verwendeten Myelom - Zelllinien NCI-H929, U266, OPM-2 und RPMI-8226 stammen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig. Ursprünglich handelt es sich dabei um Proben von Myelompatienten, die zwischen 1966 und 1982 an Kliniken in Schweden, den USA und Deutschland gewonnen wurden. Die Zelllinien unterscheiden sich zytogenetisch und immunologisch (DSMZ, Datenblätter).

Die Zellen werden in RPMI-1640-Medium mit 10-prozentigem Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS) bei 37°C, 5% CO₂ und 95-100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Letzteres wurde zuvor eine halbe Stunde lang im Wasserbad bei 56°C hitzeinaktiviert.

Die Zellen werden bis zu einer Dichte von etwa $80 \cdot 10^4$ Zellen/ml kultiviert. Dann wird die Kultur geteilt, ein Teil wird verworfen und der andere Teil mit Medium auf eine Zellkonzentration von $20 \cdot 10^4$ Zellen/ml verdünnt und weiterkultiviert. Die Zellvitalität wird vor Beginn eines Experiments mikroskopisch mittels Trypanblaufärbung sichergestellt.

Die Stromazelllinie HS-5 stammt von „American Type Culture Collection“ (ATCC) in Manassas (USA). Die Zellen produzieren verschiedene Wachstumsfaktoren, wie den Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor („Granulocyte Colony-Stimulating Factor“, G-CSF), den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor („Granulocyte-Macrophage-CSF“, GM-CSF), den Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor („Macrophage-CSF“ M-CSF), das Makrophagen-Inhibitor Protein-1α („Macrophage-Inhibitory Protein-1α“), Interleukin-1α (IL-1α), IL-1β, IL-6, IL-8 und IL-11 (ATCC, Datenblätter für CRL-11882). Auch diese Zellen werden in RPMI-1640-Medium mit 10-prozentigem Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS) bei 37°C, 5% CO₂ und 95-100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Letzteres wurde zuvor eine halbe Stunde

lang im Wasserbad bei 56°C hitzeinaktiviert. Alle zwei bis drei Tage wird die Kultur geteilt, wobei ein vorheriges vorsichtiges Ablösen der adhären Zellen von der Wand der Kulturflasche nötig ist. Ein Teil wird mit Medium verdünnt und weiterkultiviert. Vom anderen Teil wird nach Zentrifugieren der Überstand abgenommen (=HS-5-Stromazellmedium) und verwendet bzw. zur späteren Nutzung eingefroren. Das Zellpellet wird verworfen.

2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für das Einfrieren der Zellen wird zunächst ein Einfriermedium hergestellt, (5ml RPMI-1640-Medium, 3ml FCS und 2ml DMSO), das bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert wird. Anschließend werden 10^7 Zellen abzentrifugiert, zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 4,5ml Kulturmedium (RPMI-1640-Medium + 20%FCS) resuspendiert. 0,9ml der Zellsuspension werden mit 0,9ml des Einfriermediums in die Kryoröhrchen gegeben und sofort für 6 Stunden bei -20°C gelagert. Anschließend werden die Zellen für 24 Stunden bei -80°C und schließlich bei -196°C tiefgefroren.

Für das Auftauen der Zellen werden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank genommen, für 2 Minuten bei Raumtemperatur aufgewärmt und schließlich in 37°C warmes Kulturmedium überführt. Es folgen zwei Waschvorgänge mit Kulturmedium, bevor die Zellen in einer Dichte von $20 \cdot 10^4$ Zellen/ml in Zellkulturflaschen überführt werden.

2.1.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen vor Beginn eines Experiments werden 30µl der Zellsuspension mit Trypanblaulösung im Verhältnis 1:1 vermischt, gevortext und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Nur die toten Zellen nehmen aufgrund ihrer durchlässigen Membran Trypanblau auf, so dass sie sich blau anfärben und können damit unter dem Mikroskop von vitalen Zellen unterschieden werden.

2.1.4 Gewinnung mononukleärer Zellen

Zur Gewinnung mononukleärer Zellen aus Knochenmark (BMMCs: bone marrow mononuclear cells) werden 5ml heparinisiertes Knochenmarkaspirat von Myelompatienten verwendet. Zur Gewinnung der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Probanden (PBMCs: peripheral blood mononuclear cells) werden 15ml EDTA-Blut verwendet. Patienten und Probanden haben zuvor ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung des Materials für wissenschaftliche Zwecke nach Aufklärung durch einen Arzt gegeben. Ein positives Votum der Ethikkommission liegt vor.

Die Aufreinigung der mononukleären Zellen erfolgt im Rahmen einer Dichtegradienten-Zentrifugation, für welche Ficollhpaque verwendet wird. Dieses Prinzip beruht auf einer von Boyum 1968 entwickelten Methode, wobei sich die Lymphozyten und die Monozyten entsprechend ihrer spezifischen Dichte bei Zentrifugation in der Interphase zwischen Überstand (Plasma) und Ficollhpaque ansammeln (s. Abb 2.1).

Das Ficollhpaque wird auf Raumtemperatur erwärmt und 20ml davon werden in ein 50ml-Falcon-Röhrchen gegeben. Das gewonnene Material wird zunächst mit PBS auf 20ml aufgefüllt, gevortext und anschließend langsam über das Ficollhpaque geschichtet. Das Falconröhrchen wird dann bei 1500 U/min für 30 Minuten ohne Bremse bei 20°C zentrifugiert, so dass anschließend die Interphase („buffy coat“) abpipetiert werden kann. Nun erfolgt die Resuspension in Kulturmedium.

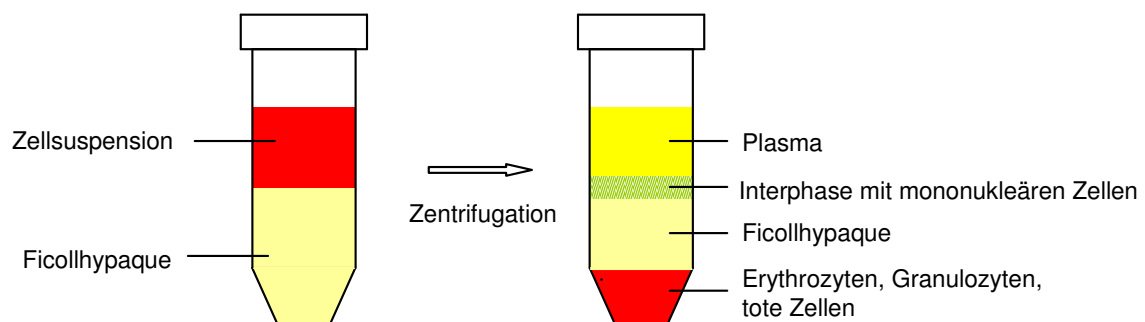


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Dichtezentrifugation. Isolierung mononukleärer Zellen mittels Ficollhpaque-Dichtegradienten-Zentrifugation

2.2 Proliferationsmessung/ WST-1-Assay

2.2.1 WST-1-Assay

Mit Hilfe des WST-1-Assays lässt sich die Anzahl metabolisch aktiver Zellen in einer Probe bestimmen. Diese Testmethode beruht darauf, dass das hellrote Tetrazolium-Salz WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) in der mitochondrialen Atmungskette vitaler Zellen durch das Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System zu einem orange-gelben Formazan reduziert wird. Diese Orangefärbung und die dadurch bedingte Zunahme der optischen Dichte der Zellsuspension kann mit Hilfe eines Photometers gemessen werden. Da nur metabolisch aktive Zellen den Farbstoff umsetzen, korreliert ihre Anzahl mit der Extinktionserhöhung bei 450nm, die gegen eine Referenzwellenlänge von 690nm im Multi-well-Photometer gemessen wird.

Für die Versuche wird eine Ausgangskonzentration von $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml verwendet. Die Motive werden jeweils als 8-fach-Ansatz in 96-well-Platten kultiviert, wobei je 100µl pro Well eingesetzt werden. Zwei Stunden vor der Messung bei 450nm am ELISA-Reader wird WST-1 im Verhältnis 1:10 zugesetzt.

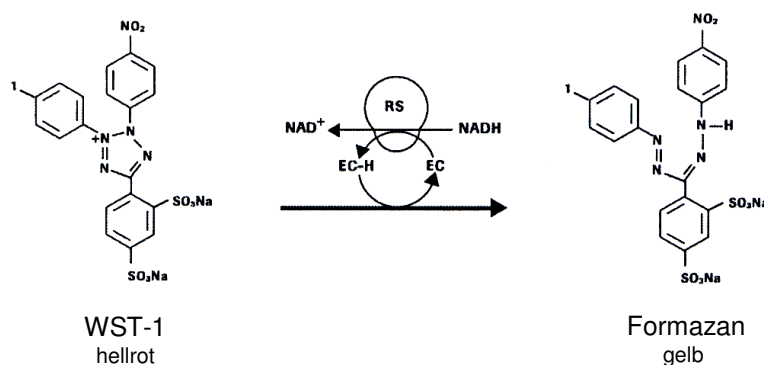


Abbildung 2.2: WST-1-Assay: Umsetzung von WST-1 zu Formazan. RS: mitochondriales Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System, EC/EC-H: elektronenbindender Reaktionspartner in der Atmungskette, NADH: Elektronendonator

2.2.2 Isobologramm Analyse

Eine Isobologramm Analyse wurde mittels der CalcuSyn Software[®] (Biosoft, Cambridge, UK) durchgeführt. Ein Kombinations-Index (CI) kleiner 0,9 lässt auf einen synergistischen Effekt schließen, während Werte zwischen 0,9 und 1,1 auf additive Effekte schließen lassen.

2.3 Durchflusszytometrische Analysen

2.3.1 Durchflusszytometrie

Bei diesem Verfahren macht man es sich zu Nutze, dass Zellen zur Lichtstreuung führen und nach spezifischer Fluorochrom-Anfärbung und Anregung durch einen Laser charakteristische optische Signale emittieren. Auf diese Weise lassen sich Zellen nach ihrer Größe, ihrer Granularität, und, je nach eingesetztem Reagenz, nach der Struktur ihrer Zellwand und nach intrazellulären Bestandteilen quantifizieren und sortieren.

Bei gezielten Fragestellungen, wie z.B. der qualitativen und quantitativen Expression eines Oberflächenmoleküls oder eines intrazellulären Bestandteils inkubiert man die Probe zunächst mit einem spezifischen Antikörper. Dieser ist durch einen Farbstoff (FITC, PE) markiert, so dass die interessierenden Zellen explizit detektiert werden können.

Um eine Verfälschung der Messung zu vermeiden, müssen die in Lösung befindlichen Zellen zunächst einzeln am Laserstrahl vorbeigeleitet werden. Um dies sicherzustellen werden die Zellen mittels hydrodynamischer Fokussierung hintereinander alle auf demselben Weg an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeführt. Die Zellen führen zu einer Ablenkung und Streuung des Lichtstrahls, auf der Zelloberfläche befindliche fluoreszenzmarkierte Antikörper werden angeregt und führen zur Emission von Photonen.

Bei der Detektion des gestreuten Lichtes unterscheidet man den so genannten „Forward Scatter“ und den „Side Scatter“: Das Laserlicht, das nur wenig in Bezug auf die Achse des einfallenden Laserstrahls abgelenkt wird, trägt den Namen „Forward Scatter“. Diese messtechnische Größe ist proportional zum Zellvolumen. Das Laserlicht, das um Winkel im Bereich von 90° zum einfallenden Laserstrahl gestreut wird, wird „Side Scatter“ genannt. Diese messtechnische Größe ist proportional zur Granularität der Zelle, die das Licht streut. Mit Hilfe dieses Parameters lassen sich so z.B. Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten differenzieren.

Das Fluoreszenzlicht, das die Zelle je nach eingesetztem Reagenz zusätzlich emittiert, ist in allen Winkeln bezogen auf den einfallenden Laserstrahl messbar (FL1, 2, 3). Es befähigt das Gerät zusätzliche Charakteristika der Zelle (z.B. die Expression

von Oberflächenmolekülen) zu messen. Eine gleichzeitige Messung mit bis zu vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Antikörpern ist möglich, wenn sich die eingesetzten Farbstoffe in ihren Emissionsspektren unterscheiden.

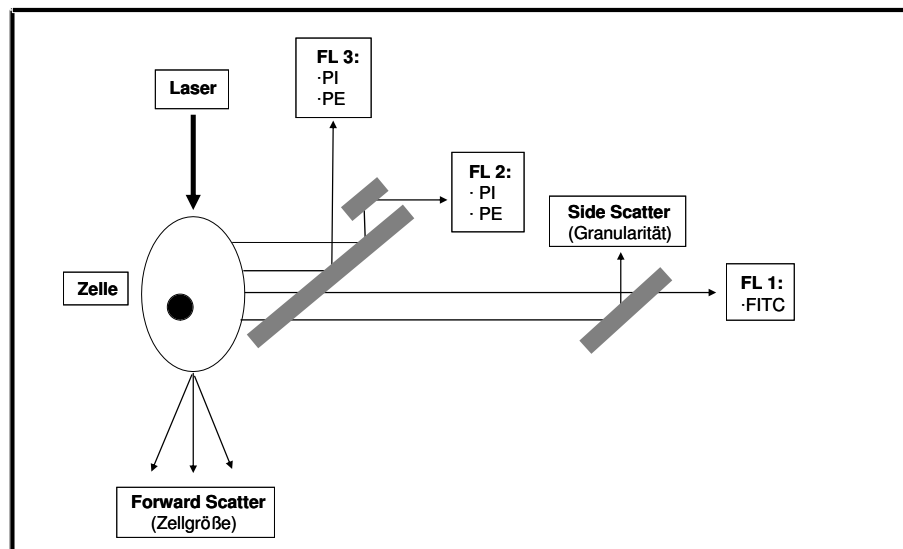


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers. Der einfallende Laserstrahl wird von der Zelle gestreut und abgelenkt (Forward Scatter und Side Scatter). Das Laserlicht führt außerdem zu einer Anregung des antikörpergebundenen Fluoreszenzfarbstoffes; er wird auf ein höheres Energieniveau gehoben. Fällt der Farbstoff wieder auf sein Ursprungsniveau zurück, so gibt er Energie in Form von Photonen ab: FL 1 bis 3 bezeichnet die verschiedenen Photonendetektoren mit einigen ihnen zugeordneten Farbstoffen.

2.3.2 Analyse der Oberflächenmarkerexpression

Für die qualitative und quantitative Analyse der Expression eines Oberflächenmarkers auf der Zellmembran werden die zu untersuchenden Zellen mit einem spezifischen, farblich (z.B. FITC, PE) markierten Antikörper inkubiert. Je nach Vorliegen des interessierenden Oberflächenmoleküls bindet der Antikörper an die Zellen, die, auf diese Weise markiert, mittels Durchflusszytometer-Analyse ermittelt werden können.

Pro Durchflusszytometer - Röhrchen benötigt man $2 \cdot 10^5$ Zellen. Die entsprechende Zelllösung wird bei 1500 U/min bei 8°C für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand wird abgekippt und anschließend werden die Zellen in 2ml PBS resuspendiert.

Nachdem 100µl dieser Lösung mit 10µl des Antikörpers/ 10µl der Isotypenkontrolle versetzt wurden, werden die Proben 10 Minuten im Dunklen inkubiert. Zum Schluss werden 0,4ml PBS hinzugefügt und die Probe kann am Durchflusszytometer analysiert werden.

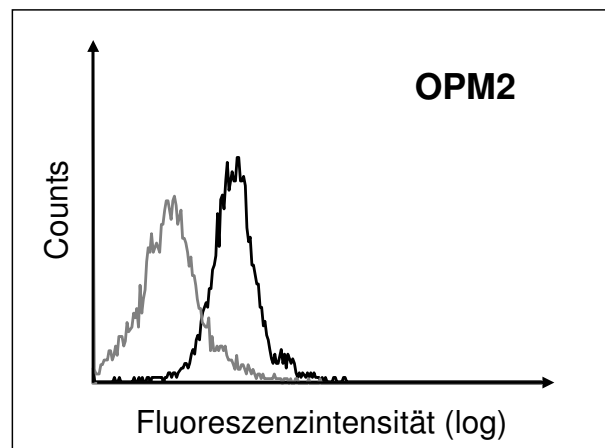


Abbildung 2.4: Oberflächenmarkermessung. Die Abbildung zeigt die relative Expressionsstärke des Oberflächenmarkers CD221 (schwarz) und die Isotypenkontrolle (grau) der Myelomzelllinie OPM2.

2.3.3 Fluoresceinisothiocyanat (FITC)

Fluoresceinisothiocyanat ist neben PE der fluoreszierende Farbstoff, der für die Durchflusszytometer-Analyse am häufigsten verwendet wird. Es handelt sich hierbei um ein kleines organisches Molekül, das typischerweise über primäre Amine oder Lysine an Proteine gebunden wird. Normalerweise sind zwischen 3 und 6 FITC-Moleküle einem Antikörper angelagert. Angeregt werden die FITC-Moleküle durch einen Argon-Laser im Bereich von 488nm. Die Energie, die sie beim Rückfall auf das ursprüngliche Energieniveau wieder abgeben, wird in Form von Photonen bei 530nm gemessen.

2.3.4 Phycoerythrin (PE)

Bei Phycoerythrin handelt es sich um ein großes Protein, das neben FITC der am häufigsten verwendete Fluoreszenzfarbstoff bei der Durchflusszytometer-Analyse ist. Zur Markierung wird ein einziges PE-Molekül an einen Antikörper gekoppelt, das nach Anregung durch einen Argon-Laser mit 488nm bei 570nm emittiert.

2.3.5 Apoptosedetektion mittels AnnexinV-FITC/PI-Markierung

Bei vitalen Zellen besteht eine ausgeprägte Asymmetrie der Zellmembran; Phosphatidylserin befindet sich bei vitalen Zellen ausschließlich auf der zytoplasmatischen Innenseite der Zellmembran. In frühen Apoptosestadien verliert die Zellmembran ihre Asymmetrie, so dass es unter anderem zur Translokation von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran kommt. AnnexinV ist ein phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin. Dieses Protein kann somit als empfindliche Sonde für die Phosphatidylserin-Exposition auf der Membranaussenseite, wie sie auf allen apoptotischen Zellen zu finden ist, eingesetzt werden. Koppelt man nun das AnnexinV mit einem Fluorescein (FITC), welches von einem Argon-Laser bei einer Wellenlänge von 488nm angeregt wird, lassen sich apoptotische Zellen durchflusszytometrisch quantifizieren.

Da nekrotische Zellen durch den Verlust der Membranintegrität ebenfalls AnnexinV binden, lassen sich allein mit Hilfe der AnnexinV- Färbung apoptotische nicht von nekrotischen bzw. spätapoptotischen Zellen unterscheiden.

Um dennoch eine Unterscheidung zwischen diesen Zellpopulationen treffen zu können, kombiniert man die AnnexinV-FITC- mit einer Propidiumiodid (PI)-Färbung. Für diesen DNA-Farbstoff ist das Eindringen in nekrotische/spätapoptotische Zellen charakteristisch, wo er sich der DNA anlagert. PI ist im Gegensatz zu FITC ein nach optischer Anregung nicht grün sondern rot fluoreszierender Farbstoff. Er wird bei 488nm angeregt und emittiert bei 617 nm.

Lebende Zellen sind folglich sowohl AnnexinV-FITC- als auch PI-negativ. An apoptotische Zellen bindet das AnnexinV-FITC, für Propidiumiodid sind sie negativ. Nekrotische/spätapoptotische Zellen lassen sich durch beide Moleküle anfärben, sie sind zweifach positiv.

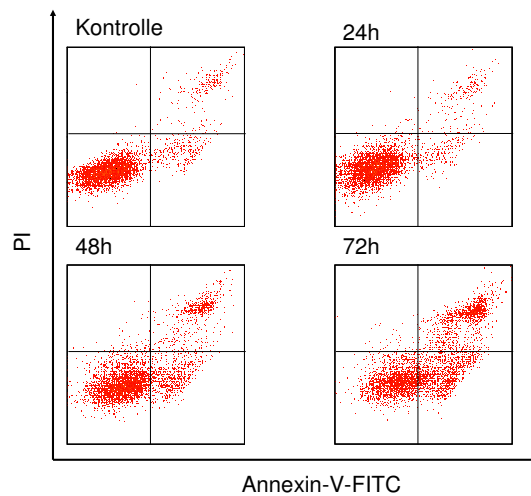


Abbildung 2.5: AnnexinV-FITC/PI-Apoptose Assay. NCI-H929 wurden über 72 Stunden mit 1 μ M NVP-AEW541 inkubiert und die Apoptoseinduktion wurde alle 24 Stunden mittels AnnexinV-FITC/PI-Färbung ermittelt. Die Abbildung zeigt eine deutliche Verlagerung der Zellen vom AnnexinV-FITC und PI negativen Bereich bei 0 Stunden über den frühapoptotischen Bereich (AnnexinV positiv, PI negativ) in den spätapoptotischen Bereich (zweifach positiv) bei 72 Stunden.

Im Einzelnen werden jeweils 4 ml einer Zellsuspension mit $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml in einer 6-well-Platte mit verschiedenen Konzentrationen einer Substanz als 3-fach-Ansatz inkubiert. Im Anschluss werden diese Zellen geerntet, bei 1500 U/min bei 8 °C 8 Minuten lang zentrifugiert und nach Abschütten des Überstandes einmal mit 1 ml kaltem PBS gewaschen, bevor das Zellpellet in 300 μ l kaltem „Binding Buffer“ resuspendiert wird. Jeweils 100 μ l dieser Zellsuspension werden in neue Durchflussszytometer-Tubes transferiert und mit 5 μ l AnnexinV-FITC versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunklen werden 10 μ l PI in einer PBS-Verdünnung von 1:20 hinzugefügt. Nach Zugabe von weiteren 300 μ l „Binding Buffer“ erfolgt nun die Analyse am Durchflussszytometer, wobei die Kanäle FL1 (Annexin V-FITC) und FL3 (Propidiumiodid) am Epics Coulter XL Durchflussszytometer verwendet werden.

2.3.6 Zellzyklusanalyse/ SubG₁-Messung

Die SubG₁-Messung ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung des DNA-Gehaltes der Zellen, woraus sich Rückschlüsse auf den Zellzyklus ziehen lassen. Es kann so u.a. untersucht werden, ob eine Substanz z.B. zu einem Zellzyklusarrest führt.

Der Zellzyklus gliedert sich in zwei Hauptphasen: die Mitosephase und die Interphase. Letztere ist durch die Replikation der DNA gekennzeichnet und wird weiter unterteilt in G₁/G₀-, S- und G₂-Phase. In der postmitotischen G₁-Phase beginnt die gerade durch Teilung entstandene Zelle zu wachsen. Als G₀-Phase bezeichnet man eine Ruhephase. Einige Zelltypen (wie z.B. Lymphozyten) können nach ihrer Ausdifferenzierung für Wochen oder Monate in der G₁-Phase verbleiben ohne sich zu teilen, so dass man die G₁- dann als G₀-Phase bezeichnet. Aus dieser ist eine Rückkehr in die G₁-Phase zur folgenden Teilung allerdings jederzeit möglich. Die G₁- und die G₀-Phase weisen einen haploiden Chromosomensatz auf. In der S-Phase (Synthesephase) erfolgt die Replikation der DNA, so dass jedes Chromosom am Ende dieser Phase aus zwei Chromatiden besteht (diploider Chromosomensatz). In der G₂-Phase, der prämitotischen bzw. Postsynthese-Phase bereitet sich die Zelle auf die Mitose vor, die anschließend in der M-Phase (Mitosephase) von staten geht. In dieser Phase erfolgt die Trennung der Chromosomen, Teilung des Zellkerns (Karyokinese) und der Zelle (Zytokinese) in zwei Tochterzellen, die sich dann wiederum in der G₁/G₀-Phase befinden. Durch Anfärbung mit einem DNA-spezifischen Farbstoff (Propidiumiodid (PI)), wird der DNA-Gehalt der Zelle durchflusszytometrisch quantifizierbar. Dadurch können zum einen Zellen detektiert werden, deren DNA-Gehalt vom klassischen Zellzyklus abweicht. Zum anderen lassen sich damit aber auch Zellen messen, die durch Apoptosevorgänge eine reduzierte Menge an DNA enthalten und sich in der sogenannten SubG₁-Fraktion befinden. Zellen dieser Fraktion haben weniger als einen kompletten Satz an DNA, sie sind hypodiploid.

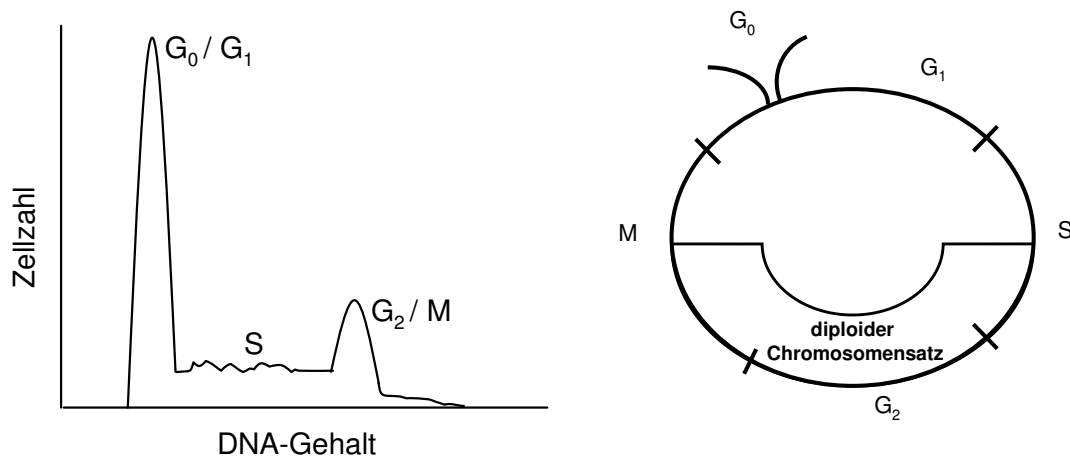


Abbildung 2.6: DNA-Histogramm und Zellzyklusschema. Aus der Messung einer Vielzahl von Zellen entsteht das DNA-Histogramm (links), wobei eine Sub-G₁-Population links des G₀/G₁-Peaks zu finden wäre. Das Schema des Zellzyklus (rechts) zeigt die verschiedenen Phasen, wobei in der M- und der S-Phase teilweise, in der G₂-Phase vollständig ein diploider Chromosomensatz vorliegt.

Im Einzelnen werden 2-4ml einer Zelllösung der Konzentration $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml verwendet. Die Zellen werden bei 1500 U/min für 6 Minuten zentrifugiert und der Überstand wird dekantiert. Nach Fixierung der Zellen durch Zugabe von 1ml 70% Ethanol wird der Ansatz bei -20°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend werden die Zellen zweifach mit eiskaltem PBS gewaschen und in 1ml PBS resuspendiert, bevor 40µl PI (1mg/ml) zum Anfärben der DNA hinzugefügt werden. Zum Entfernen der RNA, welche ebenfalls von PI angefärbt werden könnte und somit das Messergebnis verfälschen würde, werden außerdem 25µl RNase A (10mg/ml) dazugegeben. Der Ansatz wird 30 Minuten im Dunklen inkubiert und das überschüssige PI wird zweifach mit eiskaltem PBS ausgewaschen. Dann werden die Proben in neue Tubes gefiltert, um die Zellen voneinander zu separieren und so zu verhindern, dass zusammenklebende Zellen die Messung stören. So könnten zwei verklumpte G₀-Zellen als eine G₂/M-Zelle detektiert werden und auf diese Weise das Ergebnis verfälschen. Die auf Eis lagernden Zellen werden nun durchflusszytometrisch analysiert.

2.4 Western Blotting

Der Western Blot ist ein Verfahren, um die qualitative und semiquantitative Expression von Proteinen darzustellen. Dabei können in einem mehrschrittigen Verfahren verschiedene Proteine mittels Chemolumineszenz nachgewiesen werden.

Die Zellen werden lysiert und die intrazellulären Proteine der Zellen mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteine werden auf eine Membran übertragen und mit monoklonalen Antikörpern identifiziert.

2.4.1 Zelllyse

Nach Inkubation werden für jedes Motiv mindestens $1 \cdot 10^8$ Zellen lysiert, die zuvor mit unterschiedlichen Konzentrationen an Substanz bzw. unterschiedlich lange im Brutschrank inkubiert worden waren.

Die Zellen werden bei 1500 U/min für 8 Minuten bei 8°C abzentrifugiert. Der Überstand wird abgeschüttet und die Zellen werden einmal mit 4ml eiskaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach wird der Überstand dekantiert und die Zellpellets werden in 1ml PBS resuspendiert und in 1,5ml Reaktionsgefäße transferiert. Im Anschluss erfolgt eine Zentrifugation bei 2500 U/min für 6 Minuten bei 4°C, so dass der zellfreie Überstand anschließend vollständig abpipettiert und verworfen werden kann. Nach der Zugabe von 100µl Lysepuffer (s. 2.4.6) wird die Zellsuspension gut gevortext und zum Lysieren der Zellen und somit Freisetzen der intrazellulären Proteine 30 Minuten lang auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 10µl 10% NP-40 (IGEPAL CA-630) zur weiteren Lyse der Zytoplasmamembran. Nach 15-minütiger Inkubation im Überkopfschüttler bei 4°C wird die Probe bei 13.000 U/min für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände, die die interessierenden intrazellulären Proteine enthalten, werden anschließend in neue Eppendorf-Gefäße transferiert und die Pellets mit den unbrauchbaren Zellresten werden verworfen.

Nun erfolgt die Bestimmung der Proteinkonzentrationen mit Hilfe des photometrischen Bradford-Assays. Dazu werden 2µl der jeweiligen Probe mit 800µl Aqua dest. und 200µl eines Färbereagens (BioRad Protein Assay solution®) versetzt. Dieses Reagenz enthält u.a. Coomassie-Brillant-Blau, einen Triphenylmethanfarbstoff, der zum Anfärben von Proteinen verwendet wird. Er lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und färbt damit Proteine unspezifisch an.

Nach 5 Minuten wird nun die Proteinkonzentration bei 595nm auf der Grundlage einer Eichkurve mit Hilfe des Eppendorf BioPhotometers bestimmt.

2.4.2 Gel-Elektrophorese

Durch Verdünnung mit Lysepuffer werden die Proteinkonzentrationen der verschiedenen Proben einander zunächst mengenmäßig angepasst. Jeweils 50µl einer Probe werden mit Loading Buffer im Verhältnis 1:1 versetzt, um die Probe zu beschweren und später das Beladen der Geltaschen zu ermöglichen. Die Proben werden nun gut verschlossen für 5 Minuten durch Kochen denaturiert und dann bei 6000 U/min für 2 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nun folgt das Beladen der vorbereiteten Polyacrylamidgele mit den Proben.

Trenngel (für 4 Gele):

| Substanz | 10% | 12% | 15% |
|----------------------------------|--------|-------|--------|
| Aqua dest. | 10,4ml | 8,8ml | 5,9ml |
| Tris (1,5M, pH 8,8) | 6,3ml | 6,3ml | 6,3ml |
| Acrylamid/ Bis (30% (37.5:1)) | 8,3ml | 9,8ml | 12,3ml |
| APS (10%) | 250µl | 250µl | 250µl |
| TEMED | 15µl | 15µl | 15µl |

Die Trenngele werden nach den obigen Angaben gegossen, wobei die Gelplatten zu $\frac{3}{4}$ mit der jeweiligen Gellösung gefüllt und mit Isopropanol überschichtet werden, so dass ein glatter Abschluss entsteht. Nach erfolgter Polymerisation kann nach ca. 30 Minuten das Sammelgel gegossen werden.

Sammelgel (für 4 Gele):

| Substanzen | Volumen |
|---------------------------------|---------|
| Aqua dest. | 9ml |
| Tris (1M, pH 6,8) | 3,8ml |
| Acrylamid/Bis (30% (37.5:1)) | 1,9ml |
| APS (10%) | 250 µl |
| TEMED | 25µl |

Das Isopropanol wird zunächst abgekippt, anschließend wird das Sammelgel gegossen und die Kämme als „Taschenschablone“ können eingefügt werden. Nach dem Auspolymerisieren werden die Gele in die Elektrophoresebehälter gestellt, die mit Elektrophoresepuffer gefüllt werden. Die Kämme werden entfernt und die Taschen können gespült und anschließend mit jeweils 10µl der Proteinlösung bzw. 7µl des Markers (Kaleidoscope-precision plus protein standard-Biorad) beladen werden. Im Anschluss kann nun die Elektrophorese mit Hilfe des Power Supplies „Power Pac 300“ (BioRad) bei zunächst 80V gestartet werden. Nachdem die Proteine das Trenngel erreicht haben, wird die angelegte Spannung auf 100V erhöht.

2.4.3 Transferblot

Um die nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine von den Gelen auf die PVDF-Membranen zu transferieren, werden letztere und Filterpapiere zurechtgeschnitten. Die Membranen werden für 15 Sekunden in 100% Methanol, 2 Minuten in Wasser und zusammen mit den Schwämmen und Filterpapieren für 2 Minuten in Transferpuffer geschwenkt. Anschließend wird der Gellauf nach ca. 2 Stunden gestoppt, die vom Sammelgel befreiten Gele luftblasenfrei auf die vorbereiteten Membranen zwischen Filterpapiere und Schwämme gelegt, in die Transferbehälter gesetzt und diese mit Transferpuffer gefüllt. Der anschließende Transfer erfolgt bei 23V über Nacht im Kühlraum.

2.4.4 Proteinnachweis

Der Proteinnachweis basiert auf einem mehrschrittigen Verfahren, bei dem ein Primärantikörper an das Protein auf der Membran bindet. Ein Sekundärantikörper, der mit einer Peroxidase konjugiert ist und so mittels Chemolumineszenz nachgewiesen werden kann, bindet wiederum an den Primärantikörper.

Im Einzelnen werden die Membranen nach erfolgtem Transfer luftgetrocknet, bevor sie mit jeweils 15ml einer Magermilchpulverlösung (M-TBS-T) für 1 Stunde bei 40 Mot1/min auf einem Schüttler inkubiert werden, um so unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern.

Bei 70 Mot1/min werden die Membranen nun viermal für jeweils 8 Minuten gewaschen. Anschließend werden die primären Antikörper im Verhältnis 1:1000 mit TBS-T-Puffer verdünnt und jeweils 10ml davon auf die Membranen gegeben. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 40 Mot1/min im Kühlraum.

Am folgenden Tag werden die Membranen zunächst viermal mit TBS-T-Puffer bei 70 Mot1/min gewaschen, um so die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend werden jeweils 10ml der benötigten sekundären Antikörper, im Verhältnis 1:2000 mit M-TBS-T-Puffer verdünnt, hinzugegeben. Nach erfolgter Inkubation bei 40 Mot1/min über eine Stunde werden die Membranen erneut viermal mit TBS-T-Puffer bei 70 Mot1/min gewaschen, im Anschluss werden 3 ml der ECL-Lösung je Membran hinzupipettiert, bevor nach unterschiedlichen Expositionszeiten die Chemolumineszenz der Banden auf Röntgenfilm festgehalten werden kann.

2.4.5 Membran-Stripping

Um die Membranen für den Nachweis anderer Proteine wiederverwenden zu können, müssen sie zunächst von Antikörpern befreit werden.

Dazu werden die Membranen in einer Mischung aus 100ml Stripping-Lösung und 960µl Mercaptoethanol für 30 Minuten bei 50°C im Wasserbad geschwenkt. Anschließend werden die Membranen viermal bei 70 Mot1/min für jeweils 8 Minuten gewaschen und es kann mit den Arbeitsschritten des Proteinnachweises fortgefahren werden (s. 2.4.4).

2.4.6 Pufferlösungen

| | |
|---------------------------------------|--|
| Lysepuffer (für 10ml) | Aqua dest. 8.18ml, Tris (1M, pH 7.6) 250µl, NaF (1M) 100µl, EDTA (0.5M) 200µl, Aprotinin (2.1mg/ml) 50µl, Leupeptin (5mg/ml) 20µl, PMSF (100mM) 100µl, Na ₃ VO ₄ (100mM) 100µl |
| Elektrophoresepuffer (10x, pH 8.3) | Tris 151.4g, Glycin 720.65g, Natriumdodecylsulfat 50g, auf 5 l gereinigtes Wasser, pH 8.3 mit HCl einzustellen |
| Transfer-Puffer | Tris 30.28g, Glycin 144.13g, Methanol 1580ml, auf 10l gereinigtes Wasser |
| TBS (10x, pH 7.6) | Tris 121g, Natriumchlorid 400g, auf 5l gereinigtes Wasser, pH 7.6 mit HCl einzustellen |
| TBS-T-Puffer | 100ml TBS, 900ml Aqua dest., 500µl Tween20 |
| M-TBS-T | 10g Magermilchpulver, 200ml TBS-T-Puffer |
| Solution A | 200ml 0.1M TRIS-HCl (pH 8.6), 0.05g Luminol Sodium Salt |
| Solution B | 0.011g para-Hydroxycoumarinsäure gelöst in 10ml DMSO |
| ECL-Lösung | 10ml Solution A, 3µl H ₂ O ₂ , 1 ml Solution B |
| Stripping-Lösung | 7.56g Tris, 20g SDS, pH 6.7, vor der Anwendung: Zugabe von β-Mercaptoethanol |

2.5 Statistik

Die Abbildungen zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen von repräsentativen Experimenten. Die deskriptive Statistik wurde mittels Excel ausgewertet. Zum Vergleich verschiedener Gruppen wurde der Wilcoxon Test (SPSS 15.0 für Windows®) verwendet, wobei p-Werte < 0.05 als statistisch signifikant angesehen wurden.

3. ERGEBNISSE

3.1 Der IGF-1-Rezeptor (CD221) wird von den Myelomzelllinien stark exprimiert

Zunächst wurde die quantitative Expression des IGF-1-Rezeptors (CD221) auf den vier Myelomzelllinien OPM2, U266, NCI-H929 und RPMI-8226 untersucht. Hierzu wurden jeweils $2 \cdot 10^5$ Zellen der unterschiedlichen Zelllinien mit einem, gegen die α -Untereinheit des IGF-1-Rezeptors gerichteten Anti-CD221-PE-Antikörper angefärbt und anschließend am Durchflusszytometer analysiert. Zur Erfassung der relativen Expressionsstärke wurde der Index (Index = Expression des Antigens/ Expression der Isotypenkontrolle) berechnet. Bei Indices zwischen 1,0 und 1,1 wurde das Antigen als „nicht exprimiert“, zwischen $>1,1$ und <2 als „exprimiert“, zwischen 2,0 und <3 als „stark exprimiert“ und ab 3 als „sehr stark exprimiert“ gewertet.

Bei dieser Messung (Abb. 3.1) zeigte sich, dass der IGF-1-Rezeptor auf jeder der vier untersuchten Zelllinien sehr stark exprimiert war (Indices: **OPM2**: 4.18, **U266**: 3.7, **NCI-H929**: 7.8 und **RPMI-8226**: 8.5), so dass im Folgenden die Wirkung des kleinmolekularen IGF-1-Rezeptor-Antagonisten NVP-AEW 541 auf die Zelllinien genauer betrachtet wurde.

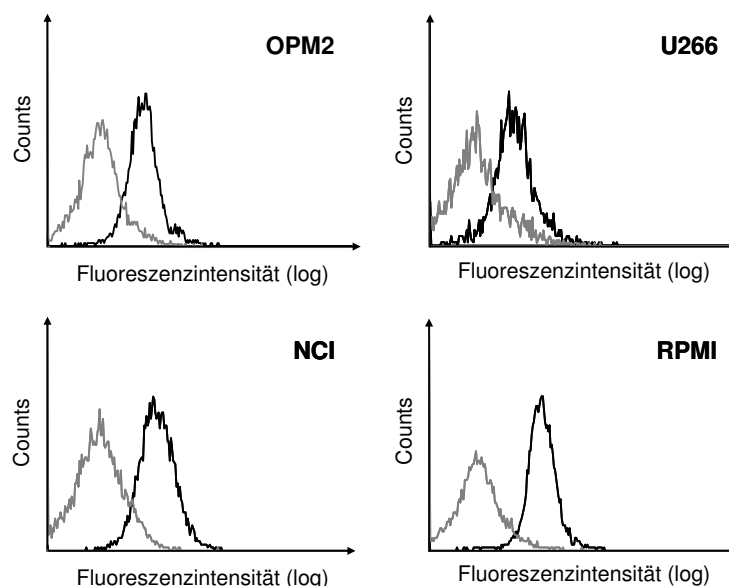


Abbildung 3.1: Der IGF-1-Rezeptor wird von allen vier Zelllinien sehr stark exprimiert. Die Expression des IGF-1-Rezeptors (CD221, schwarz) wurde bei den Zelllinien OPM2, U266, NCI-H929 (NCI) und RPMI-8226 (RPMI) gegen eine Isotypenkontrolle (grau) mittels Durchflusszytometrie gemessen.

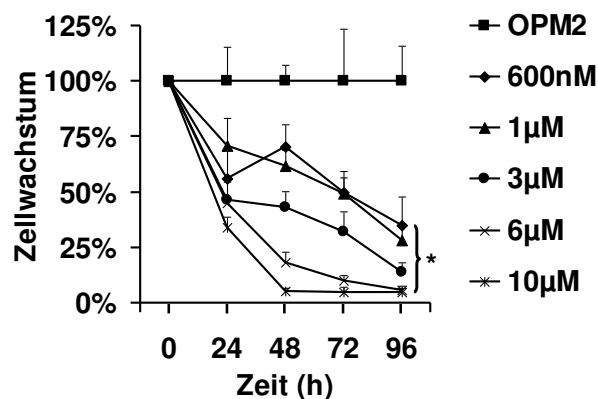
3.2 NVP-AEW541 hemmt das Zellwachstum von Myelomzelllinien

Es konnte gezeigt werden, dass auf den Myelomzelllinien OPM2, U266, NCI-H929 und RPMI-8226 der IGF-1-Rezeptor, gegen den die untersuchte Substanz NVP-AEW541 gerichtet ist, stark exprimiert ist.

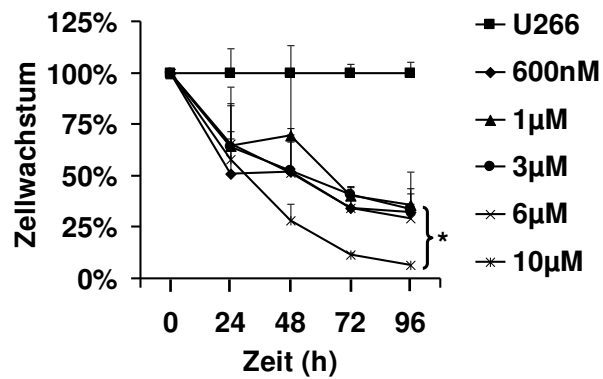
Um das Wachstumsverhalten dieser Zelllinien bei Inkubation mit dem IGF-1-Rezeptor-Antagonisten NVP-AEW541 zu analysieren, wurde dies in einem Zeitverlauf, der mittels WST-1-Assay ausgewertet wurde untersucht. Hierzu wurden $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml der Zelllinien OPM2, U266, NCI-H929 und RPMI-8226 mit steigenden Konzentrationen an NVP-AEW541 inkubiert (Abb. 3.2). Über 96 Stunden erfolgte 24-stündlich die Messung des Zellwachstums mittels WST-1-Assay.

Es konnte gezeigt werden, dass NVP-AEW541 bei allen Myelomzelllinien das Zellwachstum konzentrations- und zeitabhängig inhibiert, wobei das Wachstum der RPMI-8226-Zellen erst ab höheren NVP-AEW541-Konzentrationen ($6 \mu\text{M}$ NVP-AEW541) signifikant ($p\text{-Werte} < 0.05$) gehemmt wird (Abb. 3.2D). Nach 24-stündiger Inkubation lagen die IC_{50} -Werte zwischen 600 nM und $1 \mu\text{M}$.

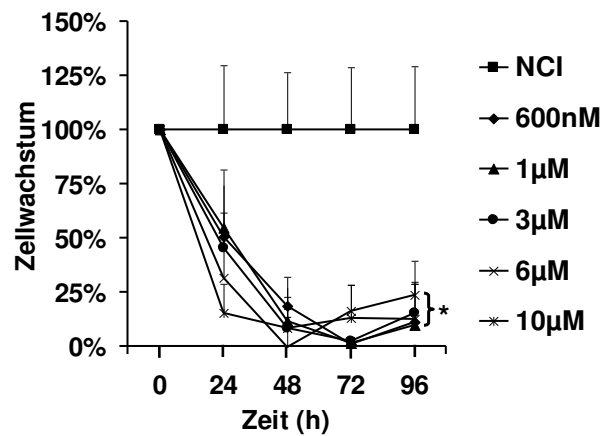
A



B



C



D

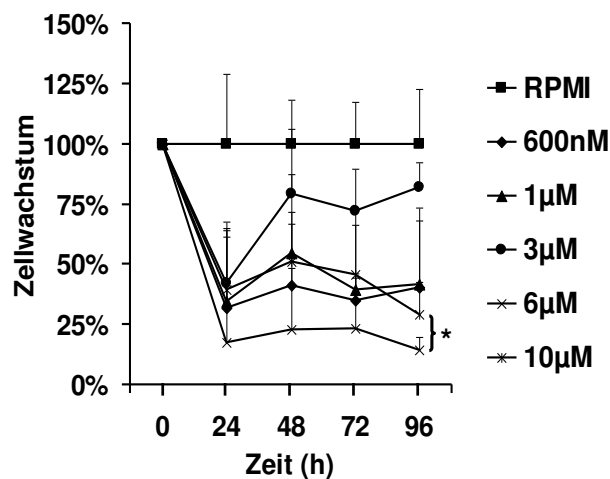


Abbildung 3.2: NVP-AEW541 inhibiert das Zellwachstum von Myelomzelllinien. OPM2 (A), U266 (B), NCI-H929 (NCI) (C) und RPMI-8226 (RPMI) (D) wurden ohne, mit 600nM, 1µM, 3µM, 6µM oder 10µM NVP-AEW541 über 96h inkubiert und alle 24h wurde das Zellwachstum mittels WST-1-Assay bestimmt. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte und die Standardabweichungen. *p < 0.05 versus Kontrolle

3.3 NVP-AEW541 induziert Apoptose bei Myelomzellen

3.3.1 NVP-AEW541 induziert Apoptose bei Myelomzelllinien

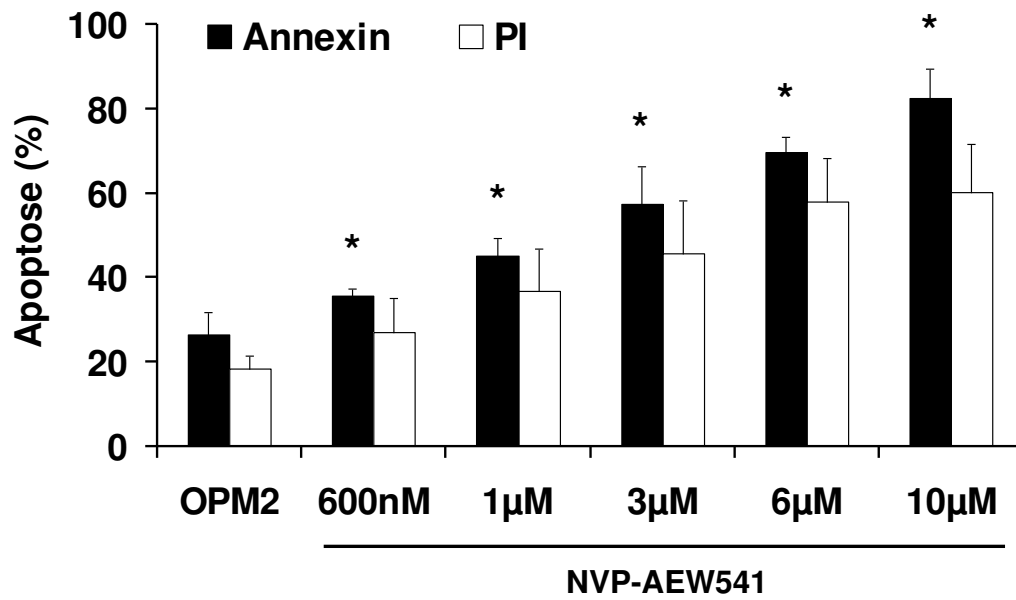
Nachdem gezeigt werden konnte, dass NVP-AEW541 zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Wachstumshemmung der Myelomzelllinien führt, stellte sich nun die Frage, ob dies durch einen Zellzyklusarrest (mit-)verursacht wird. Dies sollte durch eine SubG₁-Messung geklärt werden, wozu jeweils $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml der Myelomzelllinien OPM2 und U266 mit ansteigenden Konzentrationen an NVP-AEW541 über 72 Stunden inkubiert wurden. Anschließend erfolgte die Messung am Durchflusszytometer. Es wurde kein Zellzyklusarrest festgestellt (SubG₁: **OPM2**: 2.01%, **OPM2+ 3µM NVP-AEW541**: 0,08%; **U266**: 0,11%, **U266+3µM NVP-AEW541**: 0,37%).

Somit lag nun die Frage nah, ob bzw. zu welchem Anteil die beobachtete Wachstumshemmung der Myelomzelllinien bei Inkubation mit NVP-AEW541 durch Apoptoseinduktion verursacht wird.

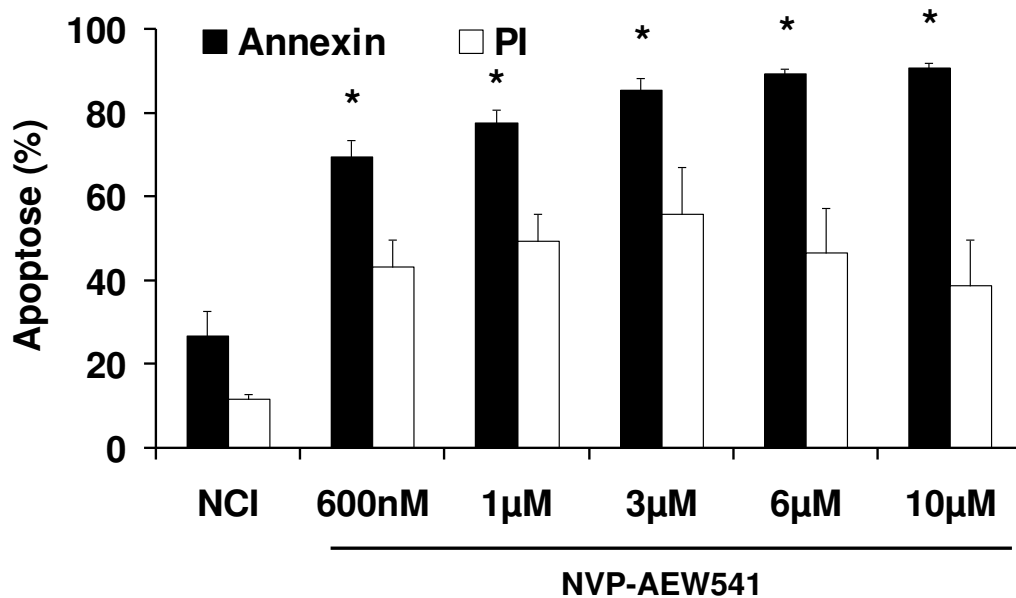
Dazu wurden jeweils $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml der Myelomzelllinien OPM2, NCI-H929, U266 und RPMI-8226 mit NVP-AEW541 als Konzentrationsreihe angesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden erfolgte die Messung der Apoptose mittels AnnexinV-FITC/PI-Färbung am Durchflusszytometer.

Es konnte gezeigt werden (Abb. 3.3), dass die Substanz NVP-AEW541 bei allen vier Myelomzelllinien zu einer signifikanten Apoptoseinduktion führt. Im Gegensatz zu den Zellen der Zelllinien U266 und RPMI-8226 waren die OPM2- und NCI-H929-Zellen bereits bei Inkubation mit geringen NVP-AEW541-Konzentrationen signifikant AnnexinV-positiv (**OPM2**: 36% bei 600nM, **NCI-H929**: 70% bei 600nM, **U266**: 12% bei 3µM/ 18% bei 6µM, und **RPMI-8226**: 36% bei 3µM).

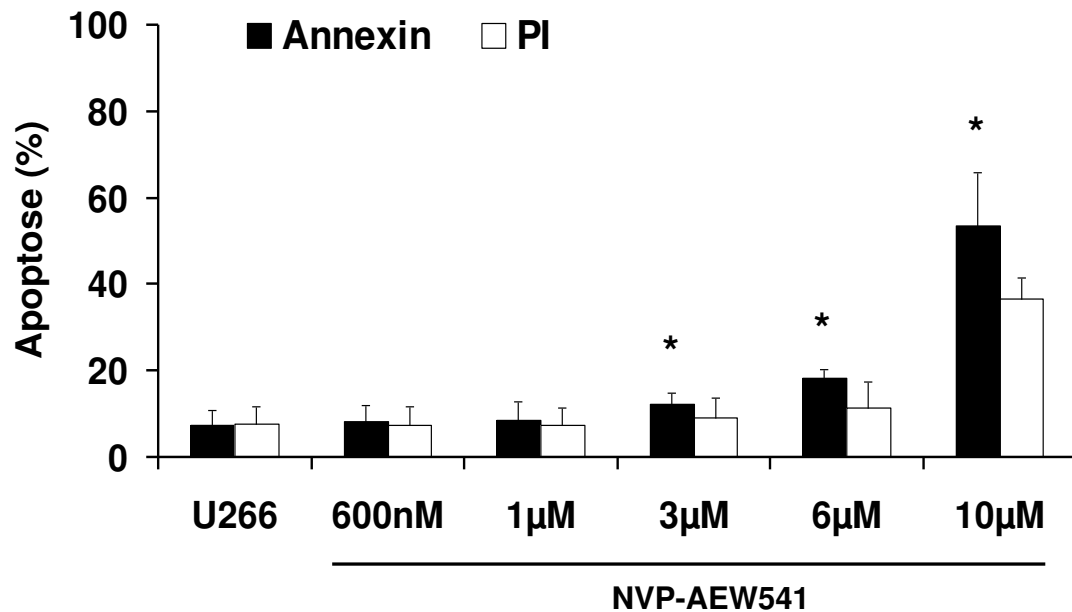
A



B



C



D

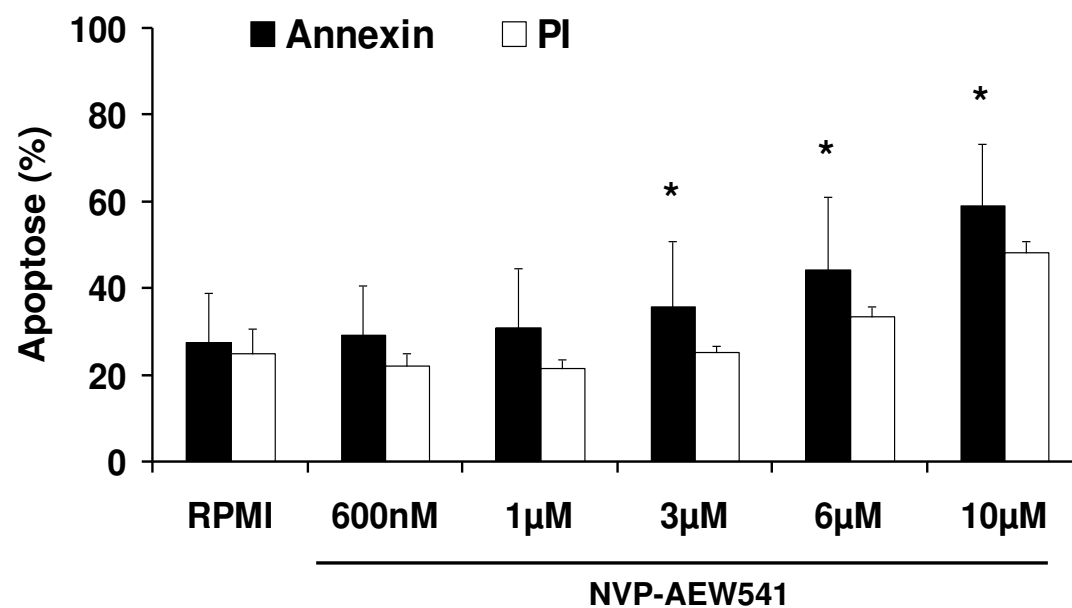


Abbildung 3.3: NVP-AEW541 induziert Apoptose in Myelomzelllinien. OPM2 (A), NCI-H929 (NCI) (B), U266 (C) und RPMI-8226 (RPMI) (D) wurden ohne, mit 600nM, 1µM, 3µM, 6µM oder 10µM NVP-AEW541 für 72 Stunden inkubiert und die Apoptoseinduktion wurde nach AnnexinV-FITC/PI-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte und die Standardabweichungen. *p < 0.05 versus Kontrolle

3.3.2 NVP-AEW541 induziert Apoptose bei primären Myelomzellen

Es konnte gezeigt werden, dass die Substanz NVP-AEW541 Apoptose bei Myelomzelllinien induziert. Zur Klärung der Frage, inwieweit sich dieses Ergebnis auf primäre Myelomzellen übertragen lässt, wurde ein Apoptose-Assay durchgeführt.

Für diesen Versuch wurde Knochenmarksaspirat von Myelompatienten ficolliert und die Zellen in einer Konzentration von $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml als Konzentrationsreihe zusätzlich mit 30 μ M Melphalan als Positivkontrolle angesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurde die Apoptose mittels AnnexinV/PI-Färbung am Durchflusszytometer bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Substanz in den BMMCs von Myelompatienten konzentrationsabhängig Apoptose induziert (Abb. 3.4).

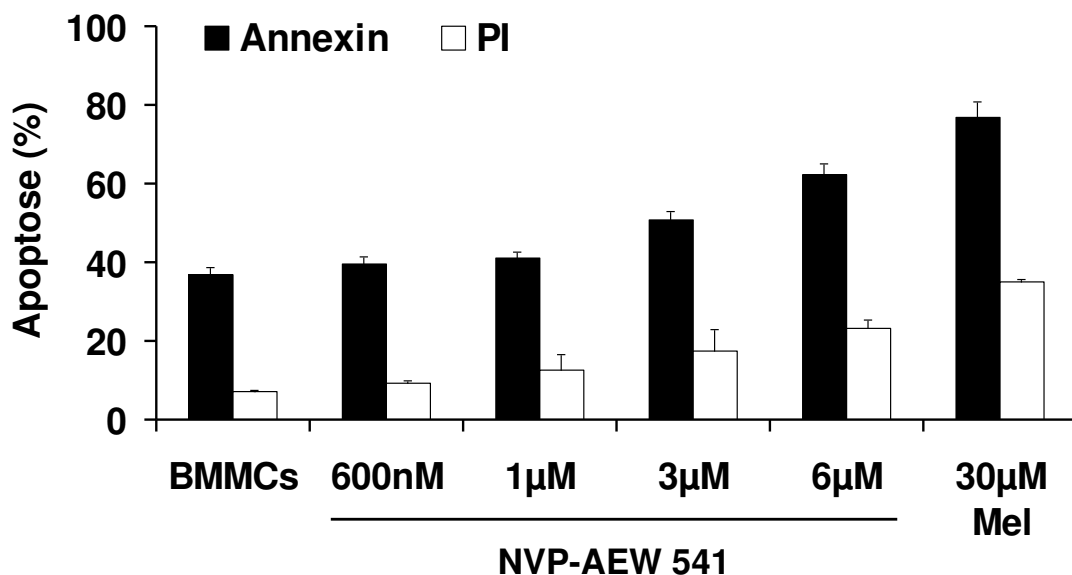


Abbildung 3.4: NVP-AEW541 induziert Apoptose in Myelomzellen (BMMCs).

Die aus dem Knochenmark von Myelompatienten gewonnenen BMMCs wurden ohne, mit 600nM, 1 μ M, 3 μ M oder 6 μ M NVP-AEW541, oder mit 30 μ M Melphalan für 48 Stunden inkubiert und die Apoptoseinduktion wurde nach AnnexinV-FITC/PI-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt.

3.3.3 NVP-AEW541 induziert keine Apoptose bei PBMCs

Zur Klärung der Frage, ob die Substanz spezifisch auf Myelomzellen wirkt oder ob die beobachtete Wirkung auf eine allgemeine unspezifische Zytotoxizität des NVP-AEW541 zurückzuführen ist, wurde ein Apoptose-Assay mit PBMCs gesunder Probanden durchgeführt.

Zur Gewinnung der mononukleären Zellen wurde das Blut gesunder Probanden ficolliert und die Zellen in einer Konzentration von $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml als Konzentrationsreihe zusätzlich mit 30 μ M Melphalan als Positivkontrolle angesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurde die Apoptose mittels AnnexinV/PI-Färbung am Durchflusszytometer bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass NVP-AEW541 keine Apoptose bei mononukleären Zellen gesunder Spender induziert (Abb. 3.5).

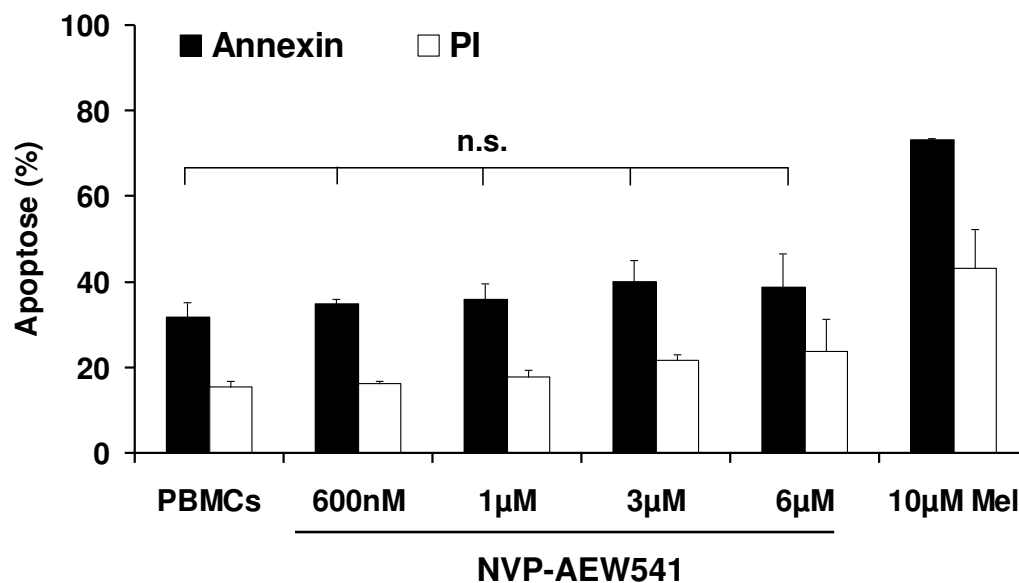


Abbildung 3.5: NVP-AEW541 induziert keine Apoptose bei mononukleären Zellen (PBMCs) gesunder Probanden.

Die aus dem peripheren Blut von gesunden Probanden gewonnenen PBMCs wurden ohne, mit 600nM, 1 μ M, 3 μ M oder 6 μ M NVP-AEW541, oder mit 30 μ M/10 μ M Melphalan für 48 Stunden inkubiert und die Apoptoseinduktion wurde nach AnnexinV-FITC/PI-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. n.s.: nicht signifikant

3.4 NVP-AEW541 hemmt die IGF-1-abhängige Proliferation der Myelomzelllinien

3.4.1 NVP-AEW541 hemmt die Proliferation der Myelomzelllinien unter IGF-1-Stimulation

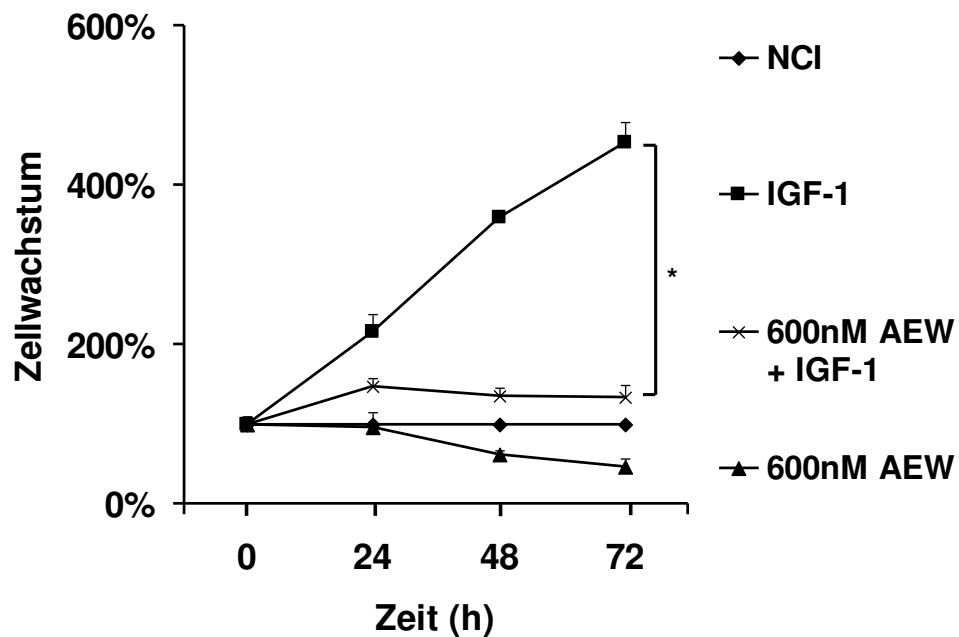
Beim Multiplen Myelom akkumulieren Plasmazellen im Knochenmark. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Zytokine und Wachstumsfaktoren wie IGF-1 das Wachstum der Plasmazellen stimulieren (Ge et al., 2000; Tu et al., 2000) und Zellüberleben und Proliferation der Plasmazellen durch Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Weges sowie des Ras/Raf/Mitogen-activated-Proteinkinase-Signalweges fördern (Grønberg et al., 1993; Brodt et al., 2000; Laviola et al., 2007). Nachdem gezeigt werden konnte, dass NVP-AEW541 bei nicht zusätzlich IGF1-stimulierten Myelomzelllinien Apoptose induziert, sollte nun der Frage nachgegangen werden, ob NVP-AEW541 die IGF-1-abhängige Proliferation zu hemmen vermag. Dazu wurde eine Konzentrationsreihe mit IGF-1-Stimulation über 72 Stunden angesetzt. $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml der Zelllinien NCI-H929 und U266 wurden mit steigenden Konzentrationen an NVP-AEW541 und/oder 200ng/ml IGF-1 in RPMI-1640-Medium ohne Zusatz von FCS inkubiert. Alle 24 Stunden wurde das Zellwachstum mittels WST-1-Assay bestimmt (Abb. 3.6).

Die Myelomzelllinien reagierten stark auf die IGF-1-Stimulation (**NCI-H929:** +353%, **U266:** +66% Zellwachstum der Kontrolle). Bei Inkubation mit NVP-AEW541 wurde das Zellwachstum stark gehemmt und der IGF-1-bedingte Stimulationseffekt nahezu aufgehoben:

NCI-H929: +33% (600nM AEW+IGF-1) vs + 353% (IGF-1)

U266: +26% (600nM AEW+IGF-1) vs +66% (IGF-1)

A



B

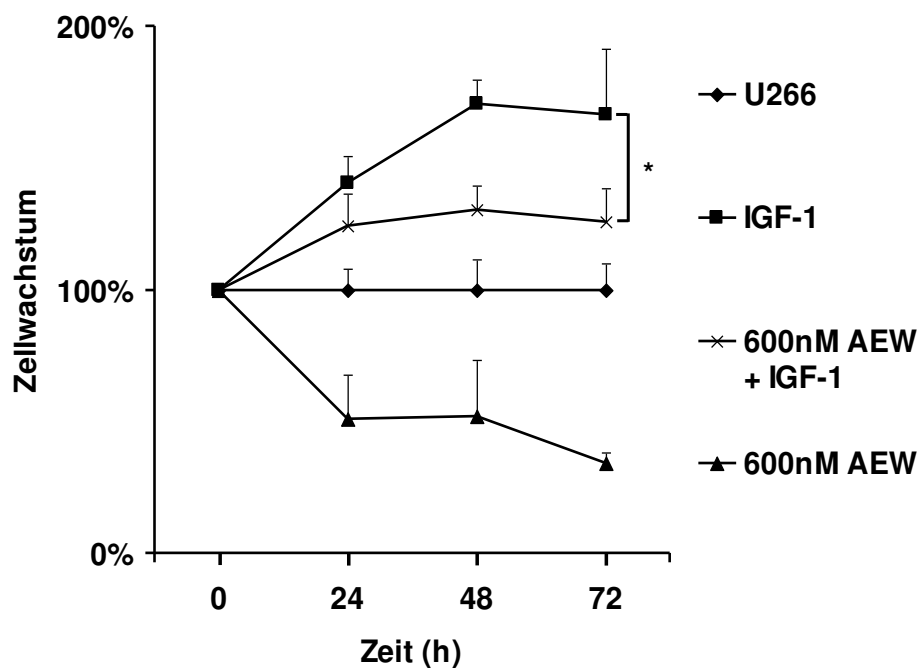


Abbildung 3.6: NVP-AEW541 inhibiert die IGF-1-induzierte Proliferationszunahme von Myelomzelllinien. NCI-H929 (NCI) (A) und U266 (B) wurden ohne oder mit 600nM NVP-AEW541 jeweils alleine und in Kombination mit IGF-1 (200ng/ml) in FCS-freiem Medium inkubiert und das Zellwachstum wurde nach 0, 24, 48 und 72 Stunden mittels WST-1-Assay bestimmt. Für die Abbildungen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen verwendet. *p < 0.05 versus Kontrolle

3.4.2 NVP-AEW541 führt zu einer geringen Abnahme der Knochenmarkstroma-Medium-vermittelten Proliferation der Myelomzelllinien

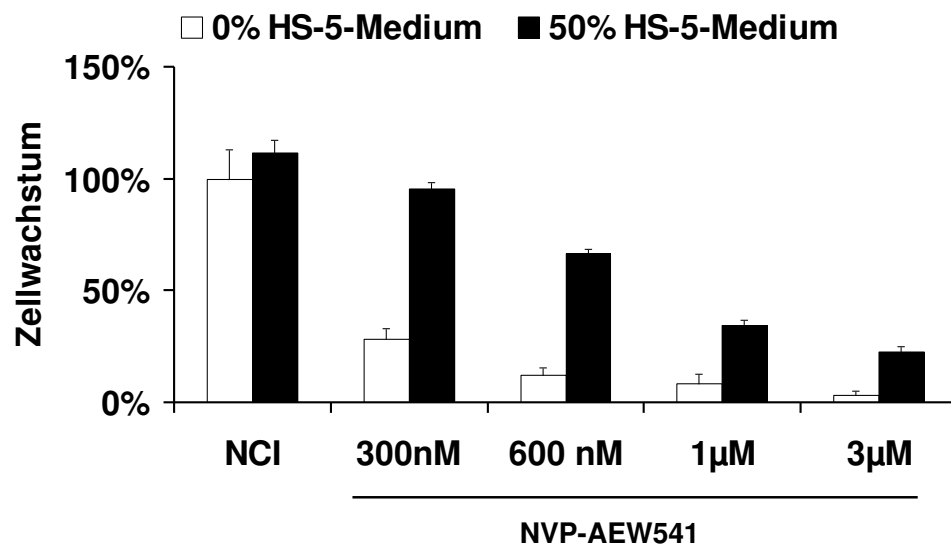
Beim Multiplen Myelom findet sich der maligne Plasmazellklon im Knochenmark, wobei das dortige Mikroenvironment/ Milieu nachweislich das Überleben, die Resistenzentwicklung, sowie die Proliferation der Myelomzellen unterstützt. Vermittelt wird dies unter anderem durch Wachstumsfaktoren wie IGF-1 (insulin-like growth factor-1) und VEGF (vascular endothelial growth factor) und Zytokine wie IL-6 (interleukin-6), IL-4 (interleukin-4), SDF-1 (stromal-derived factor-1) und andere (Baumann et al., 2007; Baumann et al., 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass NVP-AEW541 die IGF-1 vermittelte Proliferationszunahme von Myelomzelllinien gezielt inhibiert, so dass sich nun die Frage stellte, ob und inwieweit sich eine Stimulation durch verschiedene Wachstumsfaktoren, in Anlehnung an das „Microenvironment“ im Knochenmark durch NVP-AEW541 inhibieren lässt. Dazu wurden die Zellen in RPMI-1640-Medium versetzt mit 50% HS-5-Stromazell-Medium (ohne FCS) mit NVP-AEW541 inkubiert und anschließend WST-1-Assays durchgeführt.

Es wurden $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml der Zelllinien U266 und NCI-H929 mit steigenden Konzentrationen an NVP-AEW541 in FCS- freiem RPMI-1640-Medium, jeweils mit und ohne Zusatz von 50% HS5-Medium angesetzt, welches von einer 48 Stunden alten HS-5-Stromazellkultur gewonnen wurde. Das Zellwachstum wurde nach 72 Stunden mittels WST-1-Assay bestimmt (Abb. 3.7).

Auch in diesem Experiment reagierten die Zellen stark auf die Stimulation. Diese wurde vermittelt durch die im Stromazellmedium enthaltenen Wachstumsfaktoren, die in diesem Ansatz zu einer Aktivierung verschiedener Wachstumsfaktorrezeptoren auf den Zellenoberflächen führten (**NCI-H929:** +11%, **U266:** +348% Zellwachstum der Kontrolle). Bei gleichzeitiger Inkubation mit NVP-AEW541 kam es hier sowohl bei den mit HS-5-Medium inkubierten, als auch bei den ohne HS-5-Medium inkubierten Zellen zu einem konzentrationsabhängigen Abfall des Zellwachstums. Die Abnahme des durch HS-5-Medium induzierten Stimulationseffekts auf das Zellwachstum hingegen war nur gering ausgeprägt.

A



B

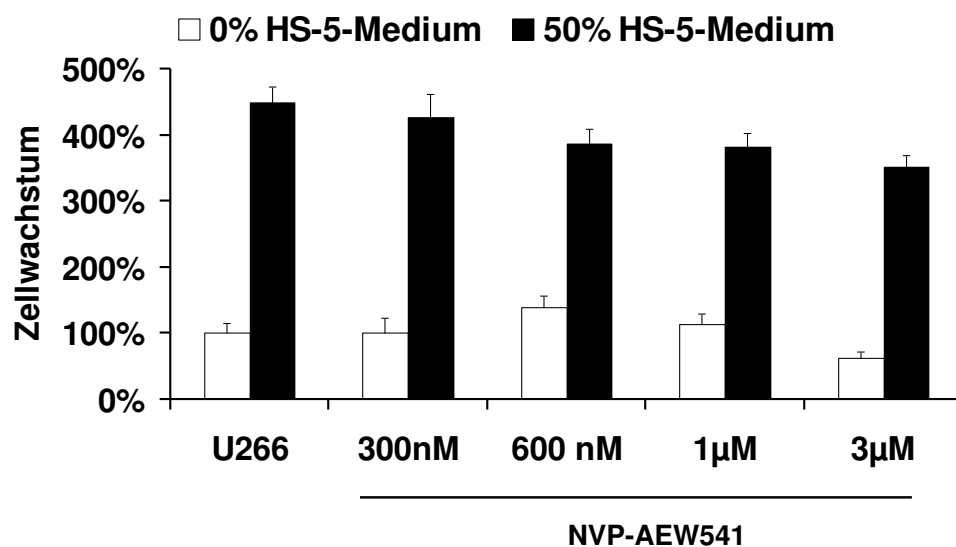


Abbildung 3.7: NVP-AEW541 führt zu einer geringen Inhibition der durch HS-5-Medium induzierten Proliferationszunahme von Myelomzelllinien. NCI-H929 (NCI) (A) und U266 (B) wurden ohne, mit 300nM, 600nM, 1µM oder 3µM NVP-AEW541 in FCS-freiem RPMI-1640-Medium, jeweils mit und ohne Zugabe von 50% HS-5-Medium inkubiert und das Zellwachstum wurde nach 72 Stunden mittels WST-1-Assay bestimmt. Für die Abbildungen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen verwendet.

3.5 NVP-AEW541 hemmt die P70S6-Kinase und 4E-BP-1

NVP-AEW541 inhibiert die Phosphorylierung des IGF-1-Rezeptors und von Akt (Maiso et al., 2008). Phosphoryliertes P70S6K und 4E-BP-1 tragen stark zur Resistenz der Myelomzellen gegen Therapeutika, zu einer Erhöhung der Proteintranslation und des Zellwachstums (Xu et al., 2005; Ikezoe et al., 2006), der Zellzyklusprogression (Lane et al., 1993) und Inhibition der Apoptose (Harada et al., 2001; Hosoi et al., 1999) bei.

Deshalb stellte sich die Frage, ob NVP-AEW541 ebenfalls zu einer Inhibition des mTOR-Signalweges, und den darauffolgenden Mediatoren P70S6K und 4E-BP-1 führt.

Zur genaueren Betrachtung dieser Proteine bei Inkubation mit NVP-AEW541 wurden Western Blot Experimente durchgeführt: Von den Zelllinien NCI-H929 und OPM2 wurden je $40 \cdot 10^5$ Zellen pro Ansatz für 2 Stunden mit oder ohne 200ng/ml IGF-1 und/oder 1µM NVP-AEW541 inkubiert.

IGF-1 alleine induzierte eine starke Zunahme der Phosphorylierung von P70S6K und 4E-BP-1 und eine leichte Zunahme von pmTOR. NVP-AEW541 alleine inhibierte die Phosphorylierung von P70S6K und 4E-BP-1 aber nicht von mTOR. Bei gleichzeitiger Inkubation mit NVP-AEW541 und IGF-1 verhinderte NVP-AEW541 die Phosphorylierung von P70S6K und 4E-BP-1, die mTOR-Phosphorylierung wurde auch hier nicht oder kaum durch NVP-AEW541 verändert (Abb. 3.8).

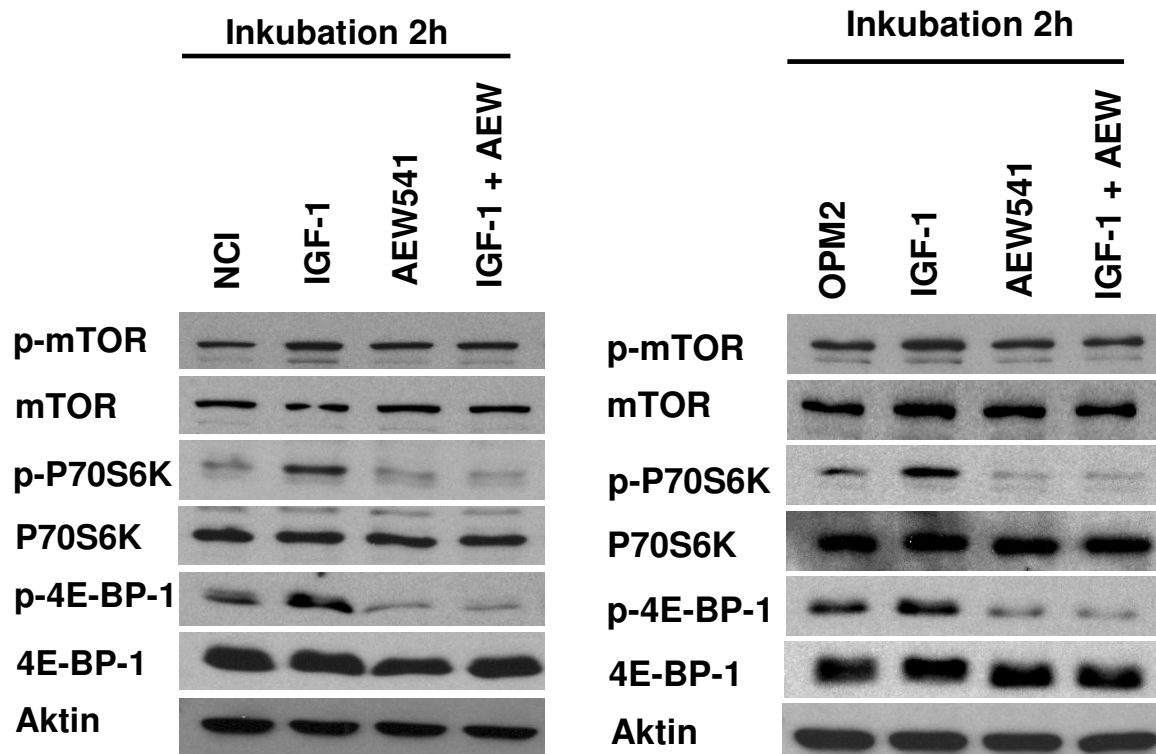


Abbildung 3.8: Inkubation der Myelomzelllinien mit NVP-AEW541 führt zu verminderter Phosphorylierung von Mediatoren des mTOR-Signalweges. NCI-H929 (NCI) und OPM2 wurden über 2 Stunden mit 200ng/ml IGF-1 und/oder 1µM NVP-AEW541 inkubiert und mit den angegebenen Antikörpern geblottet.

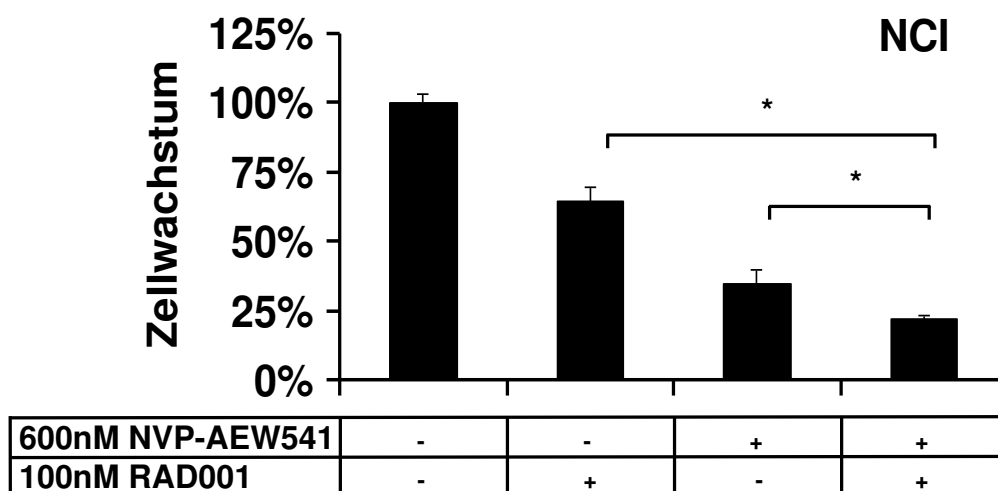
3.6 Synergismus von IGF-1-R-Inhibition und mTOR-Inhibition

3.6.1 NVP-AEW541 wirkt synergistisch mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 (Everolimus) auf die Inhibierung des Zellwachstums von Myelomzelllinien

Vorangegangene Western Blot Experimente haben gezeigt, dass sich der Phosphorylierungsstatus von mTOR unter NVP-AEW541-Einfluss nicht verändert. Zur Klärung der Frage, ob die Kombination von NVP-AEW541 mit einem mTOR-Inhibitor zu einer Zunahme der Wachstumshemmung führen könnte, wurden Zellproliferationsmessungen bei Koinkubation mit diesen beiden Substanzen durchgeführt. $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml der Zelllinien NCI-H929 und OPM2 wurden mit 600nM NVP-AEW541 oder 100nM RAD001 oder der Kombination aus beiden Substanzen über 48 Stunden inkubiert und das Zellwachstum wurde mittels WST-1-Assay bestimmt (Abb. 3.9).

Bei gleichzeitiger Inkubation von NVP-AEW541 und RAD001 zeigte die Analyse der Messwerte mit Hilfe der Calcosyn[®] Software (Biosoft, Cambridge, UK) (Tabelle 3.1), dass diese Kombination sowohl additive als auch synergistische Wirkung auf die Hemmung des Zellwachstums der Myelomzelllinien hat. Die Zunahme der Wachstumshemmung war bei den Zellen der Zelllinie NCI-H929 stärker ausgeprägt als bei den OPM2-Zellen.

A



B

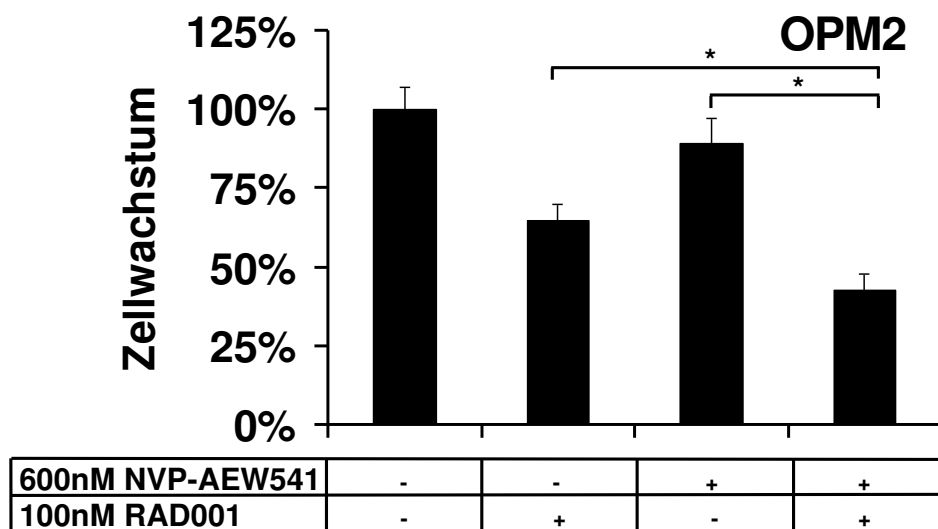


Abbildung 3.9: NVP-AEW541 wirkt synergistisch/additiv mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 auf die Inhibierung des Zellwachstums von Myelomzelllinien. NCI-H929 (NCI) (A) und OPM2 (B) wurden mit 600nM NVP-AEW541 und /oder 100nM RAD001 inkubiert und das Zellwachstum wurde nach 48 Stunden mittels WST-1-Assay bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichungen. * $p < 0.05$ versus Kontrolle

| NCI AEW541 | RAD001 | FA | CI |
|----------------|------------|----------|--------------|
| 300 | 100 | 0.403283 | 0.585 |
| 300 | 500 | 0.403283 | 0.597 |
| 600 | 100 | 0.220552 | 0.668 |
| 600 | 500 | 0.230447 | 0.693 |
| OPM2 AEW541 | RAD001 | FA | CI |
| 300 | 100 | 0.649662 | 1.090 |
| 300 | 500 | 0.63 | 3.590 |
| 600 | 100 | 0.428829 | 0.170 |
| 600 | 500 | 0.466216 | 0.281 |

Tabelle 3.1: Analyse der Messwerte mittels Calcosyn®-Software. NCI-H929 (NCI) und OPM2 wurden mit NVP-AEW541 (300nM und 600nM) und /oder RAD001 (100nM oder 500nM) inkubiert und das Zellwachstum wurde nach 48 Stunden mittels WST-1-Assay bestimmt. Zur Analyse der Messwerte hinsichtlich additiver/synergistischer Effekte wurde die Calcosyn®-Software verwendet. CI bezeichnet den Kombinationsindex. CI 1.1-0.9 bedeutet additiver Effekt, wohingegen CI < 0.9 einen synergistischen Effekt anzeigt.

3.6.2 Der mTOR-Inhibitor RAD001 (Everolimus) und NVP-AEW541 führen in Kombination zu einer stärkeren Dephosphorylierung von P70S6K und 4E-BP-1 als jede Substanz alleine.

Es konnte gezeigt werden, dass die Kombination von NVP-AEW541 und dem mTOR-Inhibitor RAD001 zu einer synergistisch/additiven Hemmung des Zellwachstums führt. Da die Proteine P70S6K und 4E-BP-1 in der Signalkaskade nach mTOR folgen, stellte sich die Frage, ob eine Kombination von NVP-AEW541 und RAD001 zu einer Zunahme der Inhibition dieser Proteine führt. Für die Western Blot Analyse inkubierten wir $40 \cdot 10^5$ Zellen der Zelllinie NCI-H929 mit $1 \mu\text{M}$ NVP-AEW541, 100 nM RAD001 oder der Kombination aus beiden Substanzen über 2 Stunden und stellten dann die Proteinexpression mittels Chemolumineszenz dar.

Es zeigte sich, dass die Kombination aus beiden Substanzen zu einer stärkeren Dephosphorylierung von p-P70S6K und p-4E-BP-1 führte als jede Substanz alleine (Abb. 3.10).

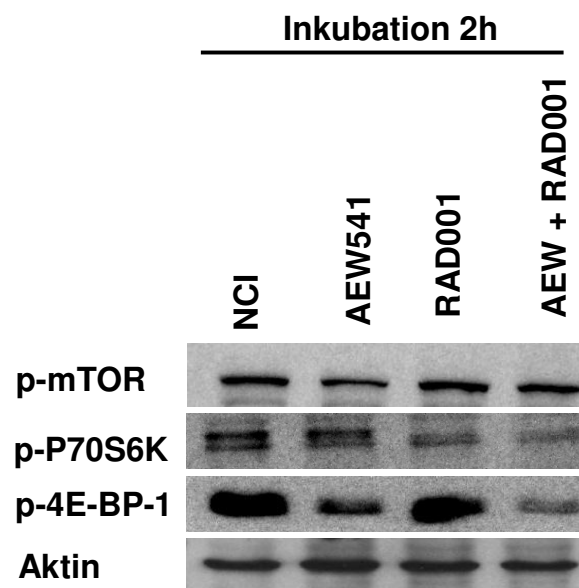


Abbildung 3.10: NVP-AEW541 und RAD001 wirken additiv auf die Dephosphorylierung von Mediatoren des mTOR-Signalweges. NCI-H929 (NCI) wurden mit 600 nM NVP-AEW541 und/oder 100 nM RAD001 über 2 Stunden inkubiert und mit den angegebenen Antikörpern geblottet.

3.6.3 NVP-AEW541 und/oder RAD001 (Everolimus) führen nicht zu einer Apoptose-Induktion bei PBMCs gesunder Spender

Zur Klärung der Frage, ob die beobachteten Effekte spezifisch für die Pathophysiologie des Multiplen Myeloms sind oder ob sie auf eine unspezifische zytotoxische Wirkung der Substanzen zurückzuführen sind, wurde die Wirkung auf die mononukleären Zellen gesunder Spender untersucht.

Zu diesem Zweck wurde das Blut gesunder Probanden zur Gewinnung der mononukleären Zellen zunächst ficolliert. Anschließend wurden die Zellen in einer Konzentration von $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml über 48 Stunden mit 600nM NVP-AEW541 oder 100nM RAD001 oder der Kombination beider Substanzen inkubiert und die Apoptose durchflusszytometrisch gemessen (Abb. 3.11).

Weder die Substanzen alleine noch die Kombination aus beiden induzierte eine Apoptose in den mononukleären Zellen gesunder Spender.

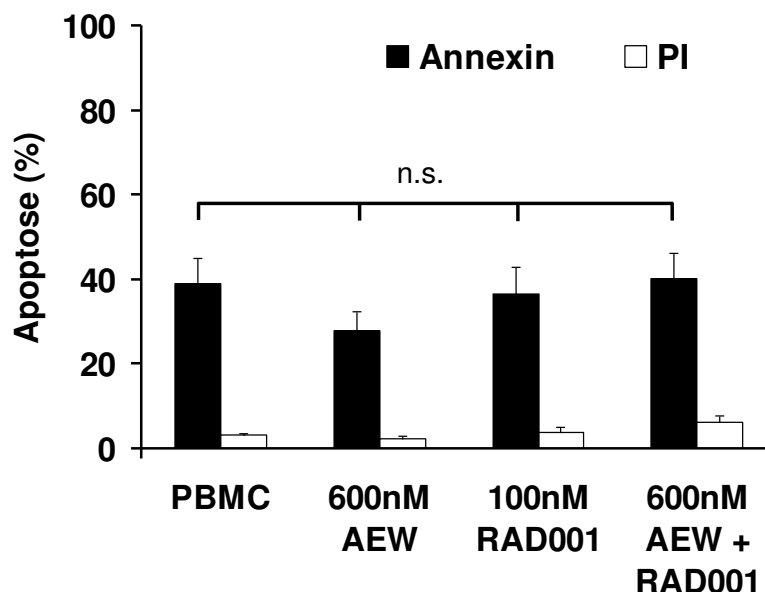


Abbildung 3.11: AEW und RAD001 führen nicht zu einer Apoptoseinduktion bei PBMCs gesunder Spender. PBMCs gesunder Spender wurden mit 600nM NVP-AEW541 und/oder 100nM RAD001 inkubiert und nach 48 Stunden wurde die Apoptose nach AnnexinV-FITC/PI-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichungen. n.s.: nicht signifikant

4. DISKUSSION

IGF-1 ist einer der wichtigsten Überlebens- und Wachstumsfaktoren für Myelomzellen und -zelllinien (Sprynski et al., 2009; Klein et al., 2003). Bataille et al. konnten in einer kleinen Kohorte mit 37 Myelompatienten bei Erstdiagnose zeigen, dass die Expression des IGF-1-Rezeptors (CD221) auf Myelomzellen einen negativen prognostischen Faktor für Myelompatienten darstellt (Bataille et al., 2005). Auch erhöhte IGF-1-Spiegel im Serum von Myelompatienten sind mit einer ungünstigen Prognose vergesellschaftet (Standal et al., 2002), wobei sich die mittleren IGF-1-Spiegel zwischen Patienten und Kontrollen in der Studie nicht unterschieden. Patienten weisen folglich nicht zwangsläufig erhöhte IGF-1-Werte auf, eine Erhöhung geht jedoch, so sie vorliegt, mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf einher.

Als Voraussetzung für die Experimente mit NVP-AEW541 wurde zunächst auf den Zellen des in vitro Modells die Expression des IGF-1-Rezeptors (CD221) semiquantitativ analysiert. Die vier untersuchten Myelomzelllinien exprimieren diesen Oberflächenmarker alle „sehr stark“, wobei die Indices zwischen 3.7 (U266) bis hin zu 8.5 (RPMI-8226) variierten.

Diese deutliche Variabilität der IGF-1-R-Expression ist nicht verwunderlich, betrachtet man die lange Entwicklung der Myelomzellklone sowohl in vivo als auch in vitro, was die Entstehung einer beachtlichen genetischen Vielfalt und folglich einer Fülle an phänotypischen Eigenschaften erlaubt (Georgii-Hemming et al., 1996).

Auf molekularbiologischer Ebene bindet IGF-1 an den IGF-1-Rezeptor und aktiviert so den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase)/ Akt-Signalweg und den Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAP-Kinase)- Signalweg in Myelomzellen ohne den Januskinase (JAK)/ Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)-Signalweg zu aktivieren. IGF-1 induziert auf diese Weise eine Zunahme der Myelomzellproliferation, des Zellüberlebens, der Myelomzellmigration, der Zelladhäsion und führt darüber zu einer Resistenz gegenüber zytotoxischen Medikamenten (Quiang et al., 2004; Tai et al., 2003).

NVP-AEW541 führte bereits im niedrigen mikromolaren Bereich zu einer starken Hemmung des Zellwachstums und induzierte Apoptose in Myelomzelllinien. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Maiso et al. (Maiso et al., 2007).

NVP-AEW541 induzierte bei den Zelllinien OPM-2 und NCI-H929 bereits im nanomolaren Bereich Apoptose, während bei den U266 und RPMI-8226 höhere Konzentrationen zur Apoptoseinduktion nötig waren. Dieser Trend spiegelt nur teilweise das Ausmaß der IGF-1-Rezeptor-Expression wider. So zeigten die Zellen der Zelllinie U266 die geringste IGF-1-Rezeptor-Expression, passend zur Beobachtung, dass höhere NVP-AEW541-Konzentrationen zur Apoptoseinduktion nötig waren. Die RPMI-8226-Zellen hingegen wiesen die höchsten IGF-1R-Werte unter den vier Zelllinien auf (Indices der CD221-Expression: U266: 3.7, RPMI-8226: 8.5), so dass kein direkter Zusammenhang zwischen den beiden Parametern IGF-1-Rezeptorexpression und Apoptoseinduktion zu bestehen scheint. Vielmehr ist davon auszugehen, dass durch gleichzeitig bestehende, mutationsbedingte Signalwegalterationen manche Myelomzellklone stärker auf die IGF1-R-Signalweghemmung reagieren als andere. Bei Inkubation mit primären Myelomzellen induzierte NVP-AEW541 bereits im niedrigen mikromolaren Konzentrationsbereich Apoptose, wohingegen die Inkubation mit mononukleären Zellen gesunder Probanden (PBMCs) keine signifikante Zunahme der AnnexinV-FITC-positiven Zellen zeigte. Die bereits bei den Zelllinien beobachtete Apoptose-induzierende Wirkung der Substanz ist somit nicht auf eine unspezifische Zytotoxizität zurückzuführen. Vielmehr scheint die Apoptose spezifisch durch Eingriff der Substanz in die Pathophysiologie des Multiplen Myeloms bedingt zu sein, so dass die mononukleären Zellen gesunder Probanden nicht beeinflusst wurden.

Beim Multiplen Myelom ist der maligne Plasmazellklon im Knochenmark lokalisiert, wobei gezeigt werden konnte, dass das dortige Mikroenvironment, bestehend aus Stromazellen, extrazellulärer Matrix und anderen Zellen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des Multiplen Myeloms spielt, indem es Überleben und Zellproliferation der Myelomzellen unterstützt (Maiso et al. 2007; Shain et al. 2000). Eine entscheidende Rolle bei dieser Interaktion spielen Zytokine und Wachstumsfaktoren, deren Transkription und Sekretion durch die Adhäsion der Myelomzellen an die Stromazellen getriggert wird (Gupta et al., 2001; Uchiyama et al., 1993). Mediatoren

von protektiven Effekten sind Wachstumsfaktoren wie IGF-1 und VEGF, sowie Zytokine, wie IL-6, IL-4 und andere (Baumann et al., 2007; Baumann et al., 2008; Gupta et al., 2001).

Aus diesem Grund wurde der Effekt des IGF-1R-Antagonisten NVP-AEW541 auf Myelomzellen untersucht, die mit IGF-1 stimuliert wurden. Wie erwartet zeigte sich, dass NVP-AEW541 das IGF-1-induzierte Zellwachstum der Myelomzellen aufhob. Allerdings zeigte sich auch hier ein Unterschied zwischen den verschiedenen Zelllinien: die Zellen der Zelllinie NCI-H929 zeigten ein sehr viel besseres Ansprechen auf die IGF-1-Stimulation (+ 353%) als die Zellen der Zelllinie U266 (+66%). Dieses Resultat lässt sich in Zusammenhang mit der IGF-1-Rezeptorexpression bringen. Bei der Oberflächenmarkermessung wiesen die Zellen der Zelllinie U266 die geringste Expression auf, was die verhältnismäßig geringe Proliferationszunahme unter IGF-1-Stimulation erklären könnte. In einer Magenkarzinomzelllinie wurde der Mangel an Stimulationseffekt durch IGF-1 allerdings durch Interferenz mit IGF-bindendem Protein (IGF-BP) erklärt (Guo et al., 1993), so dass der Zusammenhang zwischen niedriger IGF-1-Rezeptorexpression und mäßigem Stimulationseffekt, hervorgerufen durch exogenes IGF-1 nicht zu ausschließlich gesehen werden kann.

Außerdem wurde der Effekt von NVP-AEW541 auf Myelomzellen untersucht, die mit konditioniertem Medium von HS-5-Knochenmarkstromazellen inkubiert wurden. Im Gegensatz zu Maiso et al. (Maiso et al., 2007) zeigte sich nur ein moderater Effekt von NVP-AEW541 auf die so behandelten Myelomzellen. Dieses Resultat ist nicht überraschend in Anbetracht der Tatsache, dass Knochenmarkstromazellen außer IGF-1 noch zusätzlich eine Vielzahl anderer Wachstumsfaktoren und Zytokine sezernieren, die über die Stimulation verschiedener Wachstumsfaktor-Rezeptoren zu Überleben und Zellwachstum führen können (Roecklein et al., 1995). Gegensätzlich zur beobachteten Reaktion auf die IGF-1-Stimulation, wo die Zellen der Zelllinie NCI-H929 stark reagiert hatten, zeigten hier die Zellen der Zelllinie U266 eine wesentliche Proliferationszunahme (+348%), die bei den Zellen der Zelllinie NCI-H929 nur gering ausgeprägt war (+11%). Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür könnte in der unterschiedlichen Wachstumsfaktor-Rezeptorexpression liegen, wobei bei den Zellen der Zelllinie NCI-H929 der IGF-1-Rezeptor, den diese Zellen mehr als die Zellen der Zell-

linie U266 exprimieren, eine dominantere Rolle für die Proliferation der Zellen zu spielen scheint als bei den Zellen der Zelllinie U266. Somit führt die Inkubation mit dem HS-5-Medium, in dem zwar auch IGF-1 aber im Verhältnis zur isolierten IGF-1-Stimulation wenig dieses Wachstumsfaktors enthalten ist nur zu einem geringen Effekt. Interessanterweise konnte bei der HS-5-Stimulation nur bei dieser Zelllinie eine Abnahme des Zellwachstums durch NVP-AEW541 induziert werden, so dass die Vermutung nahe liegt, dass dieser Effekt hier durch Apoptose verursacht wird.

Die Proliferationszunahme der Zellen der Zelllinie U266 hingegen scheint vermehrt über die Stimulation diverser, durch das HS-5-Medium stimulierter Wachstumsfaktor-Rezeptoren vermittelt zu sein, so dass die Blockade eines einzelnen Rezeptors, des IGF-1-Rezeptors durch NVP-AEW541 nicht ausreichend ist, um eine Wachstums-hemmung herbeizuführen. Vielmehr scheint die (zusätzliche) Hemmung der gemeinsamen Endstrecke verschiedener Zytokinrezeptoren, zum Beispiel durch eine mTOR-Blockade (s.u.) für eine signifikante Proliferationshemmung nötig zu sein.

Studien haben gezeigt, dass NVP-AEW541 Zellzyklusmodulatoren, sowie mitochondriale pro- und antiapoptotische Proteine, MAP-Kinase und Akt beeinflusst (Maiso et al., 2008; Garcia-Echeverria et al., 2003). Da der PI3-Kinase/Akt/mTOR-Signalweg wichtig für Zellwachstum und -überleben ist, wurde untersucht, inwieweit die Hemmung dieses Signalwegs durch NVP-AEW541 auch die Expression von Proteinen moduliert, die in der Kaskade auf Akt folgen. Bei Myelomzellen aktiviert Akt mTOR, ein Protein, das in Zusammenhang mit dem Wachstum und Überleben von Myelomzellen steht. mTOR wiederum aktiviert P70S6K und 4E-BP-1, die beide zu einer Erhöhung der Proteintranslation und des Zellwachstums (Xu et al., 2005; Ikezoe et al., 2006), der Zellzyklusprogression (Lane et al., 1993) und Inhibition der Apoptose (Harada et al., 2001; Hosoi et al., 1999) führen. Unsere Experimente zeigen, dass NVP-AEW541 zu einer starken Hemmung der Phosphorylierung und somit der Aktivierung von P70S6K und 4E-BP-1 führt.

Überraschenderweise und im Gegensatz zu der Wirkung, die sich bei P70S6K und 4E-BP-1 zeigte, konnten wir nur eine geringe Dephosphorylierung von mTOR bei Inkubation mit NVP-AEW541 nachweisen.

Um, unter Berücksichtigung dieses Ergebnisses, eine weitere Zunahme der Hemmung des Zellwachstums von Myelomzellen zu bewirken, koinkubierten wir die Myelomzellen mit NVP-AEW541 und RAD001 (Everolimus), einem mTOR-Inhibitor, der sich bereits in klinischer Erprobung beim Multiplen Myelom befindet (Guenther et al., 2009). WST-1-Zellwachstumsmessungen bestätigten, dass eine Koinkubation dieser beiden Substanzen zu additiven und sogar synergistischen Effekten bei Myelomzellen führt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von O'Reilly et al., die zeigen konnten, dass die Kombination aus mTOR-Inhibition (durch Rapamycin) und IGF-1R-Inhibition durch NVP-AEW541 zu einer additiven Proliferationshemmung in Prostata – und Mammakarzinomzelllinien führt (O'Reilly et al., 2006).

Diese Resultate erscheinen plausibel, betrachtet man die involvierten Signalkaskaden: So führt eine Aktivierung des IGF-1-Rezeptors u.a. zu einer Herunterregulation des PI-3K-/ Akt-/ mTOR-Signalweges im Sinne einer Feedback-Schleife, teilweise vermittelt durch eine mTOR/P70S6K-abhängige Abnahme der IRS-1-Expression (Haruta et al., 2000). Folglich führt eine Inhibition von mTOR zu einem Wegfall dieses negativen Rückkoppelungsmechanismus und somit zu einer Aktivierung der Akt-Kinase, was wiederum mit einer Induktion von IRS-1 assoziiert ist (O'Reilly et al., 2006). Dies kann durch eine IGF-1R-Inhibition durch NVP-AEW541 verhindert werden und es kommt zu einer additiven bzw. synergistischen Wirkung der beiden Substanzen.

Western Blot Experimente zeigten, dass die Zunahme der Hemmung des Zellwachstums auf eine weitere Abnahme des Phosphorylierungsstatus von P70S6K und 4E-BP-1 zurückzuführen ist, während sich der Phosphorylierungsstatus von mTOR nur gering veränderte. Als Erklärungsansatz könnte hierfür in Anlehnung an die oben beschriebene Herunterregulation des PI-3K-/ Akt-/ mTOR-Signalweges im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus erneut eine solche Feed-back-Regulierung herangezogen werden. Sollten P70S6K und 4E-BP-1 zu einer Herunterregulation ergo Dephosphorylierung von mTOR im Rahmen eines negativen Rückkopplungsmechanismus führen, so bliebe diese Dephosphorylierung bei einer Blockierung von mTOR und somit von P70S6K und 4E-BP-1 aus. Dies würde sich mit unserem Versuchsergebnis decken.

Zusammenfassend stellt die Blockade des IGF-1-Rezeptors im Allgemeinen und die IGF-1R-Blockade durch den hier genauer untersuchten kleinmolekularen Tyrosinkinase-Inhibitor NVP-AEW541 einen vielversprechenden Ansatz zur Therapie des Multiplen Myeloms dar. Die Arbeit bildet eine gute Rationale für weiterführende präklinische Studien im in-vivo-Modell sowie für experimentelle klinische Studien zum Einsatz der beiden bereits in klinischer Anwendung befindlichen Substanzen NVP-AEW541 und RAD001.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Multiple Myelom ist ein aggressives, in der Regel nicht heilbares Non-Hodgkin-Lymphom mit typischer Manifestation im Knochenmark. Das Mikromilieu des Knochenmarks, bestehend aus Zellen (Stromazellen, Endothelzellen, Osteoklasten, Osteoblasten), Matrixproteinen und löslichen Faktoren (Zytokine, Interleukine) ermöglicht das langfristige Überleben der Plasmazellen, die maligne Proliferation und die Resistenz gegenüber Zytostatika.

Bei einer Vielzahl humaner Malignome konnte eine erhöhte Expression von IGF-1 (insulin-like growth factor-1) und /oder des IGF-1-Rezeptors nachgewiesen werden. Auch beim Multiplen Myelom konnte IGF-1 als einer der wichtigsten Überlebens- und Wachstumsfaktoren für Myelomzellen und –zelllinien identifiziert werden und sowohl für die IGF-1- als auch für die IGF-1-Rezeptor-Expression konnte eine negative prognostische Relevanz für Patienten gezeigt werden.

NVP-AEW541 ist ein neuartiger, oral verfügbarer Small-Molecule-Inhibitor der IGF1-R-Tyrosinkinase. In der vorgelegten Arbeit kann gezeigt werden, dass NVP-AEW541 bereits in niedriger Konzentration das Wachstum von Myelomzellen zeit- und konzentrationsabhängig hemmt. Durchflusszytometrisch konnte nach Annexin-V-Fluoresceinisothiocyanat/ Propidiumiodid-Färbung (Annexin V-FITC / PI) die Induktion von Apoptose in Myelomzelllinien, aber nicht in mononukleären Zellen des peripheren Blutes nachgewiesen werden. Die Stimulation von Myelomzellen mit IGF-1 führte zu einer signifikanten Zunahme der Proliferation, die durch die Zugabe von NVP-AEW541 wirkungsvoll gehemmt werden konnte. Die gesteigerte Proliferation von Myelomzellen unter Behandlung mit konditioniertem Medium von Knochenmarkstromazellen dagegen konnte nur partiell durch NVP-AEW541 gehemmt werden. In Western Blotting Experimenten zeigte sich eine Verminderung der Phosphorylierung von P70S6-Kinase und 4E-BP-1, aber nicht von mammalian target of rapamycin (mTOR) unter NVP-AEW541-Behandlung. Die kombinierte Hemmung von IGF-1R durch NVP-AEW541 und mTOR durch RAD001 führte zu einer synergistischen Abnahme des Myelomzellwachstums. Dies war begleitet von einer synergistischen Dephosphorylierung von P70S6-Kinase und 4E-BP-1.

Da sich beide Substanzen – NVP-AEW541 und RAD001 – bereits in klinischer Erprobung befinden, liefert die vorgelegte Untersuchung eine gute Rationale für den Einsatz von NVP-AEW541 beim Multiplen Myelom, insbesondere in Kombination mit RAD001.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- **Attal M.**, Harousseau J.L., Stoppa A.M., Sotto J.J., Fuzibet J.G., Rossi J.F., Casassus P., Maisonneuve H., Facon T., Ifrah N., Payen C., Bataille R.: A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Français du Myélome. *New England Journal of Medicine*. 1996 Jul 11;335(2):91-7.
- **Badros A.**, Barlogie B., Siegel E., Morris C., Desikan R., Zangari M., Fassas A., Anaissie E., Munshi N., Tricot G.: Autologous stem cell transplantation in elderly multiple myeloma patients over the age of 70 years. *British Journal of Haematologie*. 2001 Sep;114(3):600-7.
- **Barlogie B.**, Smith L., Alexanian R.: Effective treatment of advanced multiple myeloma refractory to alkylating agents. *New England Journal of Medicine*. 1984 May 24;310(21):1353-6.
- **Barlogie B.**, Tricot G.J., van Rhee F., Angtuaco E., Walker R., Epstein J., Shaughnessy J.D., Jagannath S., Bolejack V., Gurley J., Hoering A., Vesole D., Desikan R., Siegel D., Mehta J., Singhal S., Munshi N.C., Dhodapkar M., Jenkins B., Attal M., Harousseau J.L., Crowley J.: Long-term outcome results of the first tandem autotransplant trial for multiple myeloma. *British Journal of Haematologie*. 2006 Oct;135(2):158-64.
- **Bataille R.**, Robillard N., Avet-Loiseau H., Harousseau J.L., Moreau P.: CD221 (IGF-1R) is aberrantly expressed in multiple myeloma, in relation to disease severity. *Haematologica*. 2005 May;90(5):706-7.

- **Baumann P.**, Mandl-Weber S., Emmerich B., Straka C., Schmidmaier R.: Activation of adenosine monophosphate activated protein kinase inhibits growth of multiple myeloma cells. *Experimental Cell Research*. 2007 Oct 1;313(16):3592-603.
- **Baumann P.**, Mandl-Weber S., Oduncu F., Schmidmaier R.: Alkylating agents induce activation of NFkappaB in multiple myeloma cells. *Leukemia Research*. 2008 Jul;32(7):1144-7.
- **Berenson J.R.**, Vescio R.A.: Pathogenesis of multiple myeloma. *Uptodate version version 17.3 (www.uptodate.com)* 2009.
- **Brodtt P.**, Samani A., Navab R.: Inhibition of the type I insulin-like growth factor receptor expression and signaling: novel strategies for antimetastatic therapy. *Biochemical Pharmacology*. 2000 Oct 15;60(8):1101-7.
- **Bruno B.**, Giaccone L., Sorasio R., Boccadoro M.: Role of allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma. *Seminars in Hematology*. 2009 Apr;46(2):158-65.
- **Child J.A.**, Morgan G.J., Davies F.E., Owen R.G., Bell S.E., Hawkins K., Brown J., Drayson M.T., Selby P.J.; Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party: High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2003 May 8;348(19):1875-83.
- **Chitnis M.M.**, Yuen J.S., Protheroe A.S., Pollak M., Macaulay V.M.: The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. *Clinical Cancer Research*. 2008 Oct 15;14(20):6364-70.

- **Facon T.**, Mary J.Y., Hulin C., Benboubker L., Attal M., Pegourie B., Renaud M., Harousseau J.L., Guillermin G., Chaletteix C., Dib M., Voillat L., Maisonneuve H., Troncy J., Dorvaux V., Monconduit M., Martin C., Casassus P., Jaubert J., Jardel H., Doyen C., Kolb B., Anglaret B., Grosbois B., Yakoub-Agha I., Mathiot C., Avet-Loiseau H.; Intergroupe Francophone du Myélome: Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial. *Lancet*. 2007 Oct 6;370(9594):1209-18.
- **Fassas A.**, Shaughnessy J., Barlogie B: Cure of myeloma: hype or reality? *Bone Marrow Transplantation*. 2005 Feb;35(3):215-24.
- **Frost P.**, Moatamed F., Hoang B., Shi Y., Gera J., Yan H., Frost P., Gibbons J., Lichtenstein A.: In vivo antitumor effects of the mTOR inhibitor CCI-779 against human multiple myeloma cells in a xenograft model. *Blood*. 2004 Dec 15;104(13):4181-7.
- **García-Echeverría C.**, Pearson M.A., Marti A., Meyer T., Mestan J., Zimmermann J., Gao J., Brueggen J., Capraro H.G., Cozens R., Evans D.B., Fabbro D., Furet P., Porta D.G., Liebetanz J., Martiny-Baron G., Ruetz S., Hofmann F.: In vivo antitumor activity of NVP-AEW541-A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase. *Cancer Cell*. 2004 Mar;5(3):231-9.
- **Ge N.L.**, Rudikoff S.: Insulin-like growth factor I is a dual effector of multiple myeloma cell growth. *Blood*. 2000 Oct 15;96(8):2856-61.
- **Georgii-Hemming P.**, Wiklund H.J., Ljunggren O., Nilsson K.: Insulin-like growth factor I is a growth and survival factor in human multiple myeloma cell lines. *Blood*. 1996 Sep 15;88(6):2250-8.

- **Grønborg** M., Wulff B.S., Rasmussen J.S., Kjeldsen T., Gammeltoft S.: Structure-function relationship of the insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 1993 Nov 5;268(31):23435-40.
- **Guenther** A., Baumann P., Burger R., Klapper W., Schmidmaier R. and Gramatzki M.: 3850 "Phase I/II Study with Single Agent Everolimus (RAD001) in Patients with Relapsed or Refractory Multiple myeloma". 51st ASH Annual Meeting and Exposition, 2009 Dec 7, <http://ash.confex.com/ash/2009/webprogram/Paper23057.html>
- **Guo** Y.S., Beauchamp R.D., Jin G.F., Townsend C.M. Jr, Thompson J.C.: Insulinlike growth factor-binding protein modulates the growth response to insulinlike growth factor 1 by human gastric cancer cells. *Gastroenterology*. 1993 Jun;104(6):1595-604.
- **Gupta** D., Treon S.P., Shima Y., Hideshima T., Podar K., Tai Y.T., Lin B., Lentzsch S., Davies F.E., Chauhan D., Schlossman R.L., Richardson P., Ralph P., Wu L., Payvandi F., Muller G., Stirling D.I., Anderson K.C.: Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia*. 2001 Dec;15(12):1950-61.
- **Harada** H., Andersen J.S., Mann M., Terada N., Korsmeyer S.J.: p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 2001 Aug 14; 98(17):9666-70.

- **Haruta** T., Uno T., Kawahara J., Takano A., Egawa K., Sharma P.M., Olefsky J.M., Kobayashi M.: A rapamycin-sensitive pathway down-regulates insulin signaling via phosphorylation and proteasomal degradation of insulin receptor substrate-1. *Molecular Endocrinology* 2000 Jun;14(6):783-94.

- **Hosoi** H., Dilling M.B., Shikata T., Liu L.N., Shu L., Ashmun R.A., Germain G.S., Abraham R.T., Houghton P.J.: Rapamycin causes poorly reversible inhibition of mTOR and induces p53-independent apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Research* 1999 Feb 15;59(4):886-94.

- **Hu** L., Shi Y., Hsu J.H., Gera J., Van Ness B., Lichtenstein A.: Downstream effectors of oncogenic ras in multiple myeloma cells. *Blood*. 2003 Apr 15;101(8):3126-35.

- **Ikezoe** T., Nishioka C., Bandobashi K., Yang Y., Kuwayama Y., Adachi Y., Takeuchi T., Koeffler H.P., Taguchi H.: Longitudinal inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling by LY294002 and rapamycin induces growth arrest of adult T-cell leukemia cells. *Leukemia Research* 2007 May;31(5):673-82.

- **Jantunen** E., Kuittinen T., Penttilä K., Lehtonen P., Mahlamäki E., Nousiainen T.: High-dose melphalan (200 mg/m²) supported by autologous stem cell transplantation is safe and effective in elderly (≥ 65 years) myeloma patients: comparison with younger patients treated on the same protocol. *Bone Marrow Transplantation*. 2006 May;37(10):917-22.

- **Jemal** A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J., Thun M.J.: Cancer statistics, 2009. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2009 Jul-Aug;59(4):225-49.

- **Kastritis** E., Zervas K., Symeonidis A., Terpos E., Delimbassi S., Anagnostopoulos N., Michali E., Zomas A., Katodritou E., Gika D., Pouli A., Christoulas D., Roussou M., Kartasis Z., Economopoulos T., Dimopoulos M.A.: Improved survival of patients with multiple myeloma after the introduction of novel agents and the applicability of the International Staging System (ISS): an analysis of the Greek Myeloma Study Group (GMSG). *Leukemia*. 2009 Jun;23(6):1152-7.
- **Klein** B., Tarte K., Jourdan M., Mathouk K., Moreaux J., Jourdan E., Legouffe E., De Vos J., Rossi J.F.: Survival and proliferation factors of normal and malignant plasma cells. *International Journal of Hematology* 2003 Aug;78(2):106-13.
- **Kristinsson** S.Y., Landgren O., Dickman P.W., Derolf A.R., Björkholm M.: Patterns of survival in multiple myeloma: a population-based study of patients diagnosed in Sweden from 1973 to 2003. *Journal of Clinical Oncology*. 2007 May 20;25(15):1993-9.
- **Kumar** S.K., Rajkumar S.V., Dispenzieri A., Lacy M.Q., Hayman S.R., Buadi F.K., Zeldenrust S.R., Dingli D., Russell S.J., Lust J.A., Greipp P.R., Kyle R.A., Gertz M.A.: Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood*. 2008 Mar 1;111(5):2516-20.
- **Kyle** R.A., Gertz M.A., Witzig T.E., Lust J.A., Lacy M.Q., Dispenzieri A., Fonseca R., Rajkumar S.V., Offord J.R., Larson D.R., Plevak M.E., Therneau T.M., Greipp P.R.: Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clinical Proceedings*. 2003 Jan;78(1):21-33.
- **Kyle** R.A., Rajkumar S.V.: Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Clinical Lymphoma & Myeloma*. 2005 Sep;6(2):102-14.

- **Lamerz** R.; Hallek M.; Gassel W.D.: MANUAL Multiples Myelom 2002, Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München.
- **Lane** H.A., Fernandez A., Lamb N.J., Thomas G.: p70s6k function is essential for G1 progression. *Nature*. 1993 May 13;363(6425):170-2.
- **Laviola** L., Natalicchio A., Giorgino F.: The IGF-I signaling pathway. *Current Pharmaceutical Design*. 2007;13(7):663-9.
- **Lopaczynski** W., Terry C., Nissley P.: Autophosphorylation of the insulin-like growth factor I receptor cytoplasmic domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000 Dec 29;279(3):955-60.
- **Macaulay** V.M.: Insulin-like growth factors and cancer. *British Journal of Cancer*. 1992 Mar; 65(3):311-20.
- **Maiso** P., Ocio E.M., Garayoa M., Montero J.C., Hofmann F., García-Echeverría C., Zimmermann J., Pandiella A., San Miguel J.F.: The insulin-like growth factor-I receptor inhibitor NVP-AEW541 provokes cell cycle arrest and apoptosis in multiple myeloma cells. *British Journal of Haematology* 2008 May; 141(4):470-82.
- **Myeloma Trialists' Collaborative Group**: Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6,633 patients from 27 randomized trials. *Journal of Clinical Oncology*. 1998 Dec;16(12):3832-42.
- **O'Reilly** K.E., Rojo F., She Q.B., Solit D., Mills G.B., Smith D., Lane H., Hofmann F., Hicklin D.J., Ludwig D.L., Baselga J., Rosen N.: mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Research*. 2006 Feb 1;66(3):1500-8.

- **Oshima** K., Kanda Y., Nannya Y., Kaneko M., Hamaki T., Suguro M., Yamamoto R., Chizuka A., Matsuyama T., Takezako N., Miwa A., Togawa A., Niino H., Nasu M., Saito K., Morita T.: Clinical and pathologic findings in 52 consecutively autopsied cases with multiple myeloma. *American Journal of Hematology*. 2001 May;67(1):1-5.
- **Palumbo** A., Bringhen S., Caravita T., Merla E., Capparella V., Callea V., Cangialosi C., Grasso M., Rossini F., Galli M., Catalano L., Zamagni E., Petrucci M.T., De Stefano V., Ceccarelli M., Ambrosini M.T., Avonto I., Falco P., Ciccone G., Liberati A.M., Musto P., Boccadoro M.; Italian Multiple Myeloma Network, GIMEMA: Oral melphalan and prednisone chemotherapy plus thalidomide compared with melphalan and prednisone alone in elderly patients with multiple myeloma: randomised controlled trial. *Lancet*. 2006 Mar 11;367(9513):825-31.
- **Qiang** Y.W., Yao L., Tosato G., Rudikoff S.: Insulin-like growth factor I induces migration and invasion of human multiple myeloma cells. *Blood*. 2004 Jan 1;103(1):301-8.
- **Rajkumar** S.V., Blood E., Vesole D., Fonseca R., Greipp P.R.; Eastern Cooperative Oncology Group: Phase III clinical trial of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone alone in newly diagnosed multiple myeloma: a clinical trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*. 2006 Jan 20;24(3):431-6.
- **Rajkumar** S.V., Kyle R.A., Connor R.F.: Clinical features, laboratory manifestations, and diagnosis of multiple myeloma. *Uptodate version 17.3* (www.uptodate.com) 2009.

- **Ries** L.A.G., Eisner M.P., Kosary C.L., et al.: SEER Cancer Statistics Review, 1975-2001. Bethesda, MD, National Cancer Institute, 2004. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2002/.
- **Roecklein** B.A., Torok-Storb B.: Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes. *Blood*. 1995 Feb 15;85(4):997-1005.
- **Schmidmaier** R., Baumann P., Simsek M., Dayyani F., Emmerich B., Meinhardt G.: The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin overcomes cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma by geranylgeranylation of Rho protein and activation of Rho kinase. *Blood*. 2004 Sep 15;104(6):1825-32.
- **Schmidmaier** R., Mörsdorf K., Baumann P., Emmerich B., Meinhardt G.: Evidence for cell adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma cells in vivo. *International Journal of Biological Markers*. 2006 Oct-Dec;21(4):218-22.
- **Shain** K.H., Landowski T.H., Dalton W.S.: The tumor microenvironment as a determinant of cancer cell survival: a possible mechanism for de novo drug resistance. *Current Opinion in Oncology* 2000 Nov;12(6):557-63.
- **Sprynski** A.C., Hose D., Caillot L., Réme T., Shaughnessy J.D. Jr., Barlogie B., Seckinger A., Moreaux J., Hundemer M., Jourdan M., Meissner T., Jauch A., Mahtouk K., Kassambara A., Bertsch U., Rossi J.F., Goldschmidt H., Klein B.: The role of IGF-1 as a major growth factor for myeloma cell lines and the prognostic relevance of the expression of its receptor. *Blood*. 2009 May 7;113(19):4614-26.

- **Standal** T., Borset M., Lenhoff S., Wisloff F., Stordal B., Sundan A., Waage A., Seidel C.: Serum insulinlike growth factor is not elevated in patients with multiple myeloma but is still a prognostic factor. *Blood*. 2002 Dec 1;100(12):3925-9.
- **Tai** Y.T., Podar K., Catley L., Tseng Y.H., Akiyama M., Shringarpure R., Burger R., Hideshima T., Chauhan D., Mitsiades N., Richardson P., Munshi N.C., Kahn C.R., Mitsiades C., Anderson KC.: Insulin-like growth factor-1 induces adhesion and migration in human multiple myeloma cells via activation of beta1-integrin and phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT signaling. *Cancer Research*. 2003 Sep 15;63(18):5850-8.
- **Tu** Y., Gardner A., Lichtenstein A.: The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase pathway in multiple myeloma plasma cells: roles in cytokine-dependent survival and proliferative responses. *Cancer Research*. 2000 Dec 1;60(23):6763-70.
- **Uchiyama** H., Barut B.A., Mohrbacher A.F., Chauhan D., Anderson K.C.: Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood*. 1993 Dec 15;82(12):3712-20.
- **Venon** M.D., Roccaro A.M., Gay J., Moreau A.S., Dulery R., Facon T., Ghobrial I.M., Leleu X.: Front line treatment of elderly multiple myeloma in the era of novel agents. *Biologics*. 2009;3:99-109.
- **Xu** R.H., Pelicano H., Zhang H., Giles F.J., Keating M.J., Huang P.: Synergistic effect of targeting mTOR by rapamycin and depleting ATP by inhibition of glycolysis in lymphoma and leukemia cells. *Leukemia*. 2005 Dec;19(12):2153-8.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------------------------------|--|
| 4E-BP-1 | 4E-binding protein-1 |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| Aqua dest. | Aqua destillata |
| ATCC | American type culture collection |
| BMMC | bone marrow mononuclear cells |
| CD | cluster of differentiation |
| CI | Kombinations-Index |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| EC/EC-H: | elektronenbindender Reaktionspartner in der Atmungskette |
| ECL-Lösung | enhanced chemiluminescence-Lösung |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA-Reader | enzyme linked immunosorbent assay-Reader |
| ERK | extracellular signal-regulated proteinkinase |
| FACS | fluorescence activated cell sorting |
| FCS | fetales Kälberserum |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| G-CSF | granulocyte colony-stimulating factor |
| GM-CSF | granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor |
| Grb2 | growth factor receptor-bound protein 2 |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HCl | Chlorwasserstoff (Salzsäure) |
| IGF-1 | insulin-like growth factor-1 |
| IGF-1R | insulin-like growth factor-1 receptor |
| IGF-BP | IGF-bindendes Protein |
| IL | Interleukin |
| IMiDs® | Immunmodulatorische Substanzen |
| IRS | Insulin-Rezeptor-Substrat |
| JAK | Janus-Kinase |

| | |
|---------------------------------|--|
| MAP | mitogen-activated-proteinkinase |
| M-CSF | macrophage-colony-stimulating factor |
| MEK | mitogen-activated protein kinase kinase |
| MGUS | monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz |
| Mot1/min | Drehzahl des Motors beim Schüttler |
| M-Phase | Mitosephase |
| M-TBS-T | Magermilchpulver - TRIS buffered saline - Tween20 |
| mTOR | mammalian target of rapamycin |
| n.s. | nicht signifikant |
| Na ₃ VO ₄ | Sodium orthovanadate |
| NADH | Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form v. NAD ⁺) |
| NaF | Natriumfluorid/ Sodiumfluorid |
| NP-40 | Nonidet P-40 |
| P70S6K | p70-ribosomal S6 kinase |
| PBMC | peripheral blood mononuclear cells |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PKC-1 | 3-phosphoinositide-dependant protein kinase-1 |
| PE | Phycoerythrin |
| PI | Propidiumiodid |
| PI3K | Phosphatidylinositol-3 Kinase |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| Raf | rapidly growing fibrosarcoma / rat fibrosarcoma |
| Ras | rat sarcoma |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| RPMI-1640 | Zellkulturmedium („Roswell Park Memorial Institute“ – 1640) |
| RS | mitochondriales Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System |
| SDF-1 | stromal-derived factor-1 |
| SDS | sodium dodecyl sulfate |
| SDS-PAGE | sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis |
| SOS | son of sevenless |

| | |
|---------|--|
| S-Phase | Synthesephase |
| STAT | signal transducers and activators of transcription |
| TBS | TRIS buffered saline |
| TBS-T | TRIS buffered saline-Tween20 |
| TEMED | Tetramethylethyldiamin |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |
| WST-1 | water soluble tetrazolium-1 |

8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Einleitung

| | | |
|----------|---|---|
| Abb. 1.1 | Wichtige Signalwege beim Multiplen Myelom | 7 |
|----------|---|---|

Patienten, Material und Methoden

| | | |
|----------|---|----|
| Abb. 2.1 | Schematische Darstellung der Dichtezentrifugation | 10 |
| Abb. 2.2 | WST-1-Assay: Umsetzung von WST-1 zu Formazan Quelle: Roche; Cell Proliferation Reagent WST-1 | 11 |
| Abb. 2.3 | Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers | 13 |
| Abb. 2.4 | Oberflächenmarkermessung | 14 |
| Abb. 2.5 | AnnexinV-FITC/ PI-Apoptose Assay | 16 |
| Abb. 2.6 | DNA-Histogramm und Zellzyklusschema | 18 |

Ergebnisse

| | | |
|----------|---|--------|
| Abb. 3.1 | Der IGF-1-Rezeptor wird von allen vier Zelllinien sehr stark exprimiert | 25 |
| Abb. 3.2 | NVP-AEW541 inhibiert das Zellwachstum von Myelomzelllinien | 26, 27 |

| | | |
|-----------|---|--------|
| Abb. 3.3 | NVP-AEW541 induziert Apoptose in Myelomzelllinien | 29, 30 |
| Abb. 3.4 | NVP-AEW541 induziert Apoptose in Myelomzellen (BMMCs) | 31 |
| Abb. 3.5 | NVP-AEW541 induziert keine Apoptose bei mononukleären Zellen (PBMCs) gesunder Probanden | 32 |
| Abb. 3.6 | NVP-AEW541 inhibiert die IGF-1-induzierte Proliferationszunahme von Myelomzelllinien | 34 |
| Abb. 3.7 | NVP-AEW541 führt zu einer geringen Inhibition der durch HS-5-Medium induzierten Proliferationszunahme von Myelomzelllinien | 36 |
| Abb. 3.8 | Inkubation der Myelomzelllinien mit NVP-AEW541 führt zu verminderter Phosphorylierung von Mediatoren des mTOR-Signalweges | 38 |
| Abb. 3.9 | NVP-AEW541 wirkt synergistisch/additiv mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 auf die Inhibierung des Zellwachstums von Myelomzelllinien | 39, 40 |
| Tab. 3.1 | Analyse der Messwerte mittels Calcosyn [®] -Software | 40 |
| Abb. 3.10 | NVP-AEW541 und RAD001 wirken additiv auf die Dephosphorylierung von Mediatoren des mTOR-Signalweges | 41 |
| Abb. 3.11 | NVP-AEW541 und RAD001 führen nicht zu einer Apoptoseinduktion bei PBMCs gesunder Spender | 42 |

9. ANHANG

9.1 Verwendete Materialien und Geräte

9.1.1 Zellkultur

| Kurzbezeichnung | Bestell-Nr. | Hersteller |
|-----------------|-------------|-----------------------|
| NCI-H929 | ACC 163 | DSMZ, Braunschweig, D |
| OPM2 | ACC 50 | DSMZ, Braunschweig, D |
| RPMI – 8226 | ACC 402 | DSMZ, Braunschweig, D |
| U266 | ACC 9 | DSMZ, Braunschweig, D |
| HS-5 | CRL-11882 | ATCC, Manassas, USA |

| | | |
|---------------------------|-------------|--------------------------------|
| RPMI – 1640 | BE12 – 702F | Lonza, Basel, CH |
| PBS | 20012-068 | Gibco Invitrogen, Karlsruhe, D |
| FCS | 16170 – 078 | Gibco Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Flask 25 cm ² | 353.014 | BD Falcon, Heidelberg, D |
| Flask 75 cm ² | 353.136 | BD Falcon, Heidelberg, D |
| Flask 175 cm ² | 353.118 | BD Falcon, Heidelberg, D |

| | | |
|-------------------|-------------|---|
| Pipette 5ml | 86.1253.001 | Sarstaedt, Nümbrecht, D |
| Pipette 10ml | 86.1254.001 | Sarstaedt, Nümbrecht, D |
| Pipette 25ml | 86.1685.001 | Sarstaedt, Nümbrecht, D |
| Pipetus-Akku | - | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D |
| Cell Scraper 25cm | 353.086 | BD Falcon, Heidelberg, D |
| Cell Scraper 40cm | 353.087 | BD Falcon, Heidelberg, D |

| | | |
|------------------------|-----------|--------------------------------|
| Trypanblaulösung | 15250-061 | Gibco Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Neubauer Zählkammer | - | Sarstaedt, Nümbrecht, D |

| | | |
|----------------|------------|------------------------------|
| Röhrchen 15ml | 62.554.502 | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| Röhrchen 50ml | 62.547.254 | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| 6-well-plates | 353.453 | BD Falcon, Heidelberg, D |
| 24-well-plates | 353.047 | BD Falcon, Heidelberg, D |
| 96-well-plates | CLS 3596 | Corning Costar, Corning, USA |

9.1.2 Zytostatika

| Name | Bestellnummer | Firma |
|-----------|---------------|----------------------------------|
| Melphalan | M2011 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |

9.1.3 Inhibitoren

| Name | Bestellnummer | Firma |
|-------------------|---------------|----------------------------------|
| NVP-AEW541 | WKL-136.478 | Novartis, Basel, CH |
| RAD001/Everolimus | 07741 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |

9.1.4 Zytokine

| Name | Bestellnummer | Firma |
|-----------|---------------|------------------------------|
| (rh)IGF-1 | 291-G1 | R&D Systems, Wiesbaden, D |

9.1.5 Antikörper für die Oberflächenmessungen

| Antikörper | Klon | Bestellnummer | Firma |
|---------------------------------|------|---------------|-------------------------------------|
| CD 221-PE (IGF-1R α) | 1H7 | 555999 | BD Biosciences, Heidelberg, D |
| IgG ₁ PE | | PN IMO670 | Immunotech/Coulter, Marseille, F |

9.1.6 Antikörper für die Western Blot Analyse

9.1.6.1 Primärantikörper

| Antikörper | Bestellnummer | Firma |
|------------|---------------|---|
| mTOR | 2972 | CellSignaling, Frankfurt/Main, D |
| p-mTOR | 2971 | CellSignaling, Frankfurt/Main, D |
| p70S6K | 9202 | CellSignaling, Frankfurt/Main, D |
| p-p70S6K | 9204 | CellSignaling, Frankfurt/Main, D |
| 4E-BP-1 | 9452 | CellSignaling, Frankfurt/Main, D |
| p-4E-BP-1 | 9455 | CellSignaling, Frankfurt/Main, D |
| Aktin | sc-1616 | SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D |

9.1.6.2 Sekundärantikörper

| Antikörper | Bestellnummer | Firma |
|------------------------------|---------------|-------------------------|
| Schwein Anti-Kaninchen/ HRP | P0217 | Dako , Carpinteria, USA |
| Kaninchen Anti-Ziege Ig/ HRP | P0449 | Dako, Carpinteria, USA |

9.1.7 Enzyme

| Enzym | Bestellnummer | Firma |
|---------------|----------------|-------------------------------|
| Trypsin- EDTA | T3924 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |
| RNase A | 10 109 169 001 | Roche, Mannheim, D |

9.1.8 Chemikalien

| Substanz | Bestellnummer | Firma |
|---|----------------------|--|
| ECL | RPN2106 | Amersham, Little Chalfont, UK |
| AnnexinV-FITC | AnnexinV01-3 | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| WST-1 | 11644807001 | Roche, Penzberg, D |
| Marker: Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards | 161-0375EDU | Bio-Rad, München, D |
| Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate | 500-0006 | Bio-Rad, München, D |
| Propidiumiodid | 537059 | Calbiochem/ Merck, Darmstadt, D |
| Ficoll Paque | 17-1440-03 | Amersham, Little Chalfont, UK |
| PMSF | 93482 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |
| Leupeptin | L2884 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |
| EDTA | 351-027-100 | Quality Biological , Inc. Gaithersburg, USA |
| Aprotinin | A6279 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |
| Tween 20 | P7949 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |
| Acrylamid/Bis (30% (37.5:1)) | 161-0158 | Bio-Rad, München, D |
| APS | 161-0700 | Bio-Rad, München, D |
| TEMED | 161-0800 | Bio-Rad, München, D |
| NP-40 | 74385 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |

9.1.9 Sonstige Artikel für den Western Blot

| Artikel | Bestellnummer | Firma |
|-----------------------------------|---------------|--|
| Mini-PROTEAN-Comb, 10 wells, 1mm | 165-3359 | Bio-Rad, München, D |
| Spacer Plates | 165-3311 | Bio-Rad, München, D |
| Schwämme, 8 x11cm | 170-3933 | Bio-Rad, München, D |
| SDS-PAGE Standards, broad range | 161-0318 | Bio-Rad, München, D |
| Immobilon-P PVDF Membran | IPVH00010 | Millipore, Schwalbach, D |
| Kodak Biomax XAR- 5.165.1454 Film | F5513 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |
| NaCl | S7581 | Mallinckrodt, Hazelwood, USA |
| NaF | S1504 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |
| Na ₃ VO ₄ | S6508 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |
| Tris, pH 7,5 1M | 351-006-100 | Quality Biological, Inc. Gaithersburg, USA |

9.1.10 Geräte

| Gerät | Bestellnummer | Firma |
|---------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| Durchflusszytometer | Epics CL System II, Version 3.0 | BeckmanCoulter, Miami, USA |
| Elektrophoreseset | Ready Gel Cell | Bio-Rad, München, D |
| Power Pac | 164-5050 | Bio-Rad, München, D |
| BioFuge | 75005181 | Heraeus instruments, Osterode, D |
| Biophotometer | - | Eppendorf, Hamburg, D |
| Brutschrank | Serie II 3110 | Forma Scientific, Waltham, USA |
| Zentrifuge | Sigma-Aldrich 4K1 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D |
| Zentrifuge | Rotina 46R | Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, D |
| ELISA Reader | Mithras | Berthold, Bad Wildbad, D |

9.2 Danksagungen

Danken möchte ich

PD Dr. med. Ralf Schmidmaier für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Übernahme der Doktorvaterschaft, für konstruktive Kritik, Zuverlässigkeit und Hilfsbereitschaft

Dr. med. Philipp Baumann für die Ermöglichung dieser Arbeit und die gute Betreuung

Dr. rer. nat. Sonja Mandl-Weber für eine unvergessliche Zeit im Labor, die geduldige Beantwortung meiner Fragen in theoretischen und praktischen Belangen, die eine oder andere mathematische Nachhilfe, für gute Ratschläge, Unterstützung, sowie für die gute Zusammenarbeit, die weit über den Laboralltag hinaus ging. Danke!

Karin Müller, Swetlana Paljan, Petra Rank, Sabine Reinkunz und Brigitte Schnabel: Schön war's!